MIKROCHEMIE

VEREINIGT MIT

MIKROCHIMICA ACTA

UNTER MITWIRKUNG VON

E. ABDERHALDEN † - Zürich • E. ABRAHAMCZIK - Ludwigshafen/Rhein • H. K. ALBER - Philadelphia • V. A. ALUISE - Delaware • W. G. BATT - Newark, Del. • G. BECK - Bern R. BELCHER - Birmingham • G. BERTRAND - Paris • J. H. DE BOER - Delft • M. BOETIUS - Dresden • E. R. CALEY - Columbus • M. CEFOLA - New York • G. CHARLOT - Paris N. D. CHERONIS - Chicago • CH. CIMERMAN - Haifa • L. C. CRAIG - New York • W. R. CROWELL - Los Angeles • G. DENIGES - Bordeaux • H. J. DEUTICKE - Göttingen • C. DUVAL - Paris A. ELEK - Los Angeles • H. v. EULER - Stockholm • J. F. FLAGG - Schenectady • H. A. FREDIANI - Rahway • M. F. FURTER - Nutley • W. GEILMANN - Hannover • A. O. GETTLER - New York J. GILLIS - Gent • E. GLEDITSCH - Blindern • G. GORBACH - Graz • H. HOLTER - Kopenhagen E. W. D. HUFFMAN - Denver • A.-G. HYBBINETTE - Skelleftehamn • G. INGRAM - Maidenhead • E. KAHANE - Paris • W. KIRSTEN - Uppsala • J. A. KUCK - New York A. LACOURT - Bruxelles • H. LEVIN - Beacon • K. LINDERSTRØM-LANG - Kopenhagen A. J. LLACER - Rosario • J. MATTHEWS - Wolverton • W. C. McCRONE - Chicago • J. A. MEANS - Brooklyn • R. F. MILTON - London • R. H. MÜLLER - New York • J. B. NIEDERL - New York C. J. VAN NIEUWENBURG - Delft • R. E. OESPER - Cincinnati • F. PAVELKA - Firenze M. E. POZZI-ESCOT - Lima / Peru • J. R. RACHELE - New York • J. B. RATHER - Brooklyn C. J. RODDEN - New Brunswick • L. ROSENTHALER - Istanbul • H. ROTH - Limburgerhof J. B. SANDELL - Minnesota • W. I. SASCHEK - Chicago • E. SCHULEK - Budapest • G.-M. SCHWAB - Athen • J. SENDROY - Bethesda • S. SIGGIA - Easton, Pa. • D. D. VAN SLYKE - Upton A. E. SOBEL - Brooklyn • J. A. SOZZI - Buenos Aires • A. STEYERMARK - Nutley N. STRAFFORD - Manchester • A. L. THOMPSON - Montreal • A. TISELIUS - Uppsala J. UNTERZAUCHER - Leverkusen • W. A. WATERS - Oxford • P.-E. WENGER - Genève P. W. WEST - Baton Rouge • H. H. WILLARD - Ann Arbor • M. L. WILLARD - State College C. L. WILSON - Belfast • L. K. YANOWSKI - New York • J. H. YOE - Virginia • K. ZIEGLER - Mülheim/Ruhr • W. ZIMMERMANN - Melbourne

HERAUSGEGEBEN VON

A. A. BENEDETTI-PICHLER (NEW YORK) G. BLIX (UPPSALA) F. FEIGL (RIO DE JANEIRO) J. HEYROVSKÝ (PRAHA)

H. LIEB (GRAZ) F. SCHNEIDER (NEW YORK) R. STREBINGER (WIEN)

XXXVI./XXXVII. BAND

ZWEITE HÄLFTE / MIT 177 ABBILDUNGEN / ABGESCHLOSSEN AM 4. JANUAR 1951

BERICHT ÜBER DEN I. INTERNATIONALEN MIKROCHEMISCHEN CONGRESS

GRAZ, 2.—6. JULI 1950

SCHRIFTLEITUNG: M. K. ZACHERL - WIEN

WIEN · SPRINGER-VERLAG · 1951

Mikrochem.

XXXVI./XXXVII. Band Zweite Hälfte

Inhaltsverzeichnis

Seite

Antweiler, H. J. Die Empfindlichkeitsgrenzen optischer Meßmethoden bei Mikroelektrophorese und Mikrodiffusion 561

Mizushima, S., T. Shimanouchi und T. Sugita. Aufnahme von Raman-Spektren mit geringen Substanzmengen 574

Nebbia, G. Der Einfluß des Lösungsmittels auf das Absorptionsspektrum des Indigos 576

Prodinger, W. Die Bestimmung kleinster Manganmengen mit Arnolds Reagens 580

Ferrari, C. Über die photometrische Mikrobestimmung der Kieselsäure 585

Cozzi, D. und S. Vivarelli. Die Oxydation des Germaniums(2) an der Quecksilbertropfelektrode und ihre analytische Anwendung 594

Ciusa, W. und G. Nebbia. Über die Grenzen des Anwendungsbereiches der Extrapolationsmethode bei photometrischen und fluorometrischen Analysen 601

Gorbach, G. Grundzüge der angewandten Mikrochemie..... 604

Kirsten, W. Einige Arbeiten auf dem Gebiet der quantitativen organischen Mikro-Elementaranalyse..... 609

Wurzschmitt, B. Die gleichzeitige Bestimmung von Stickstoff und Wasserstoff in organischen Substanzen..... 614

Dirscherl, A. und H. Wagner. Zur Ausführung der Mikrostickstoffbestimmung nach Dumas 628

Wagner, H. Bemerkungen zur Kohlenstoff-Wasserstoffbestimmung .. 634

Wagner, H. und F. Bühler. Volumetrische Mikrobestimmung von Chlor, Brom und Schwefel in organischen Substanzen nach der Spiralrohrmethode 641

Padowetz, W. Über die volumetrische Mikrobestimmung von Schwefel in stickstoffhaltigen organischen Substanzen 648

Martin, F. Quelques perfectionnements proposés pour le dosage sélectif rapide par voie chimique des halogènes organiques (ou minéraux)... 653

Martin, F. Microdétermination rapide des cendres sulfuriques dans les matières organiques (dosage des métaux alcalins) 660

Renard, M. et Paulette Deschamps. Le microdosage de l'azote amidé et α aminé par la méthode aux acides chlorhydrique et nitrique concentrés 665

Marzadro, Margherita. Das Verhalten von Ringstickstoff bei der Mikromethode nach Kjeldahl 671

Belcher, R. and R. Goulden. The Micro-determination of Carbon and Hydrogen in Fluorine-containing Organic Compounds 679

Ingram, G. Rapid Micro Combustion Methods for the Determination of Elements in Organic Compounds..... 690

Unterzaucher, J. Über die elementaranalytische Bestimmung des Sauerstoffes, eine daraus entwickelte C-H-Bestimmung und eine neue Ausführungsform der N-Dumasmethode für schwerverbrennliche Substanzen 706

Fortsetzung auf der III. Umschlagseite

Aus dem Chemischen Institut der Universität Bonn a/Rhein.

Die Empfindlichkeitsgrenzen optischer Meßmethoden bei Mikroelektrophorese und Mikrodiffusion.

Von

H. J. Antweiler.

Mit 10 Abbildungen.

(Eingelangt am 30. November 1950.)

Bei der elektrophoretischen Analyse und der Messung der Diffusionskonstanten wird der Konzentrationsverlauf einer Lösung in Abhängigkeit von der Zellenhöhe gemessen. Für diese Messung sind zwei Verfahren üblich:

1. die *Toepler*sche Schlierenmethode, die den Brechungsgradienten in Abhängigkeit von der Zellenhöhe anzeigt, und

2. die interferometrischen Verfahren, die die Brechungszahl im Vergleich zum Lösungsmittel an jedem Ort der Zelle direkt anzeigen.

Da Brechungsgradient und Brechungszahl der Konzentration einer Lösung eindeutig zugeordnet werden können, geben beide Verfahren die Konzentration der Lösung in jeder Höhe der Zelle (x).

Beide Verfahren werden in mehreren Modifikationen angewendet. Das *Toepler*sche Verfahren wird in den Ausführungen nach *Lamm*[1], *Svensson*[2], *Longworth*[3] und *Philpot*[4] benutzt; bei den interferometrischen Verfahren mißt man mit weißem[5] oder monochromatischem Licht[6,7]. Die Empfindlichkeitsgrenzen der Verfahren sollen diskutiert werden.

Zuerst sei festgelegt, daß unter *Meßempfindlichkeit* oder *Auflösungsvermögen* einer Methode der kleinste Brechungsunterschied (Δn) unter Berücksichtigung der Zellentiefe (a) verstanden ist, der bei optimaler Einstellung und Justierung der Apparatur mit Sicherheit nachgewiesen werden kann; der *optische Meßfehler* ist der optisch bedingte Fehler, mit dem die Brechungszahl in einer beliebigen Zellenhöhe gemessen werden kann.

A. Das Toeplersche Verfahren in der Modifikation Svensson.

Bei dem Verfahren nach *Svensson*[2] wird durch eine Kombination von Spalten und Linsen der Brechungsgradient als Funktion der Zellenhöhe abgebildet. Die Abb. 1 zeigt die Anordnung. Die waagrechte Lichtlinie *I* wird über die sphärische Linse *II*, in deren unmittelbarer Nähe die Küvette *III* mit der Tiefe *a* liegt, auf den geneigten Spalt *IV*

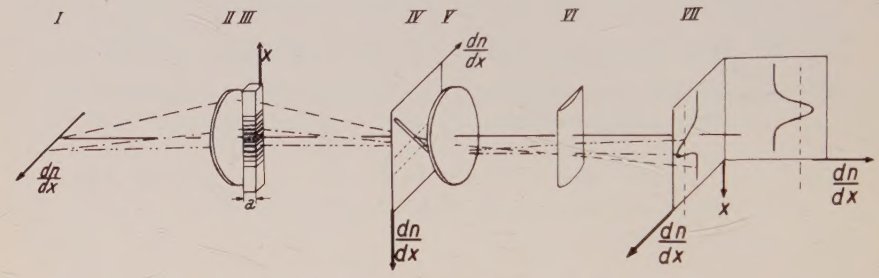


Abb. 1. Die schlierenoptische Anordnung nach *Svensson*.

abgebildet. Der Spalt *IV* wird durch die Zylinderlinse *VI* auf die Beobachtungsebene *VII* projiziert; gleichzeitig bildet die sphärische Linse *V* die Meßzelle *III* ebenfalls auf der Beobachtungsebene ab.

Die Anordnung ist vollkommener, wenn an Stelle der sphärischen Linse V eine asphärische Linse derart angeordnet wird, daß die Zelle in der Senkrechten auf der Beobachtungsebene und in der Waagrechten auf der Zylinderlinse VI abgebildet wird.

Svensson gibt als „the least measurable Δn" den Wert

$$a \cdot \Delta n = 9\,\lambda$$

an. Dieser Wert wird von *Labhard* und *Staub*[5] (S. 1958) experimentell bestätigt. Da aber *Hannsen*[8] einen rund zehnmal kleineren Wert für die Empfindlichkeit der *Toepler*schen Schlierenmethode ableitet und eigene Untersuchungen weder mit der Rechnung von *Svensson* noch mit der experimentellen Bestätigung von *Labhard* und *Staub* übereinstimmten, schien es lohnend zu sein, die Empfindlichkeit dieser viel angewendeten Methode zu überprüfen.

Wir stimmen mit *Svensson* darin überein, daß die Grenzempfindlichkeit der Methode durch die Beugungserscheinungen an den Spalten begrenzt wird, glauben aber, daß man berücksichtigen muß, daß zwei benachbarte Stellen der Küvette mit gleichem Brechungsgradienten ($x_1 \neq x_2$; $n_1 \neq n_2$; $dn/dx_{(x1)} = dn/dx_{(x2)}$) in der Bildebene *phasenverschoben* interferieren. *Alle Stellen der Küvette mit gleichem dn/dx werden auf der Bildebene von demselben Punkte der Lichtquelle und somit kohärent ab-*

gebildet. Die Ausdehnung des Beugungsbildes in der Bildebene ist durch die senkrechte Apertur der Linse V bedingt; sie ist demnach bei gegebenen optischen Abständen reziprok zur Höhe des geneigten Spaltes. Wenn die Beugungsbreiten der Punkte gleichen dn/dx in die Größenordnung ihrer Abstände kommen, interferieren sie merklich; da sie phasenverschoben

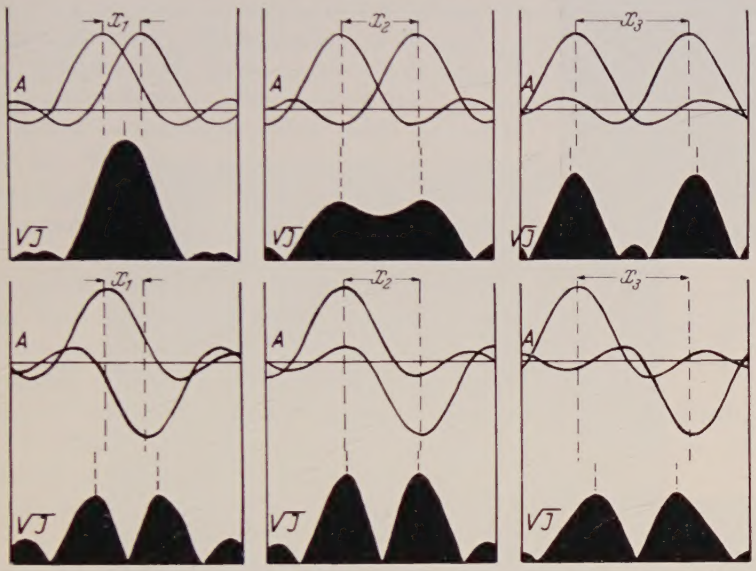


Abb. 2. *Die Amplituden- und Intensitätskurven*, in denen zwei Punkte mit gleichem dn/dx im Abstand x_1 (x_2; x_3) abgebildet werden. In den oberen Kurven ohne Phasendifferenz interferierend; in den unteren Kurven mit der Phasendifferenz von einer halben Wellenlänge.

interferieren, dürfen nicht die Intensitäten, sondern es müssen die Amplituden addiert werden.

Eine triviale Rechnung zeigt, daß die Punkte der Zelle durch Helligkeitsmaxima in der Bildebene wiedergegeben werden, die ihrem Abstand in der Zelle nicht entsprechen; die Helligkeitsmaxima zeigen einen größeren oder kleineren Abstand als dem Punkteabstand entspricht. Diese Abweichung muß bei der Integration der *Svenssonkurven* berücksichtigt werden.

Zur Erläuterung diene die Abb. 2. Die obere Abbildung zeigt die Amplitudenkurven für den Fall, daß die Wegdifferenz Δs der kohärenten Strahlen im Auftreffpunkt für verschiedene Abstände in der Küvette $\Delta s = m \cdot \lambda$ ist, wenn m eine ganze Zahl bedeutet. Darunter ist die Wurzel der Intensität aufgetragen. Die nächste Reihe zeigt für die gleichen Abstände die Amplitudenkurven für den Fall, daß $\Delta s = (m \pm {}^1/_2)\,\lambda$ ist; auch hier sieht man, daß die darunter gezeichneten Kurven der Intensität ihre Maxima nicht im Abstande x wiedergeben.

Die Abb. 3 zeigt die *Svenssonaufnahme* einer Proteinlösung in monochromatischem Licht; der Brechungsanteil der schnellstwandernden Komponente betrug $\Delta n \cdot a \cong 75\,\lambda$. Man erkennt eine ganz typische, gezackte Form der Kurve und eine zwiebelförmige Verzeichnung des Kopfes.

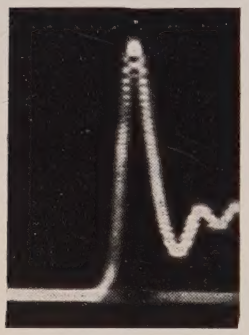


Abb. 3. *Svenssonaufnahme einer Proteinlösung* im monochromatischen Licht. Der Brechungsunterschied der schnellstwandernden Komponente: $a \cdot \Delta n \simeq 75\,\lambda$.

Um diese eigentümliche Verzeichnung des Kopfes zu deuten — diese Verzeichnung beobachtet man in mehr oder weniger ausgeprägtem Maße bei allen *Svenssonkurven* — wurde versucht, die Helligkeitsverteilung auf der Bildebene für ein bestimmtes Beispiel rechnerisch zu erfassen. Es wurde eine *Gaußsche* Kurve mit üblichem Höhen- und Seitenverhältnis und eine übliche Beugungsbreite zugrunde gelegt. Aus diesen beiden Annahmen allein wurde unter Berücksichtigung der Phasenverschiebung die Intensität errechnet, die in jedem Punkt des *Svenssondiagramms* wirksam ist. Die Wurzel der Intensität wurde in sieben abgestuften Grautönen in das Diagramm eingetragen; die zugrunde gelegte *Gaußsche* Kurve ist gestrichelt eingetragen.

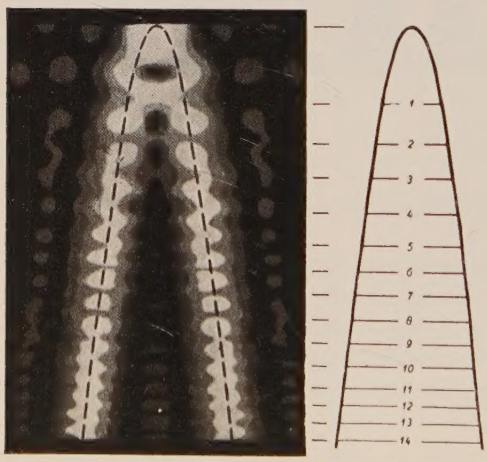


Abb. 4. *Errechnete Helligkeitsverteilung* eines *Svenssondiagramms* für den Gipfel einer *Gaußschen* Kurve. Die Fläche des Gipfels entspricht einem $a \cdot \Delta n = 14\,\lambda$.

Die Abb. 4 zeigt das Ergebnis. Die Kurve der maximalen Helligkeit pendelt um die *Gaußsche* Kurve; am Kopf selbst zeigen sich ausgesprochene Helligkeitsgipfel und Helligkeitstäler. Bis auf eine Fläche am Kopf der Kurve, die einem $a \cdot \Delta n = 2\,\lambda$ entspricht, wird die *Gaußsche* Kurve durch die Kurve der maximalen Helligkeit ausreichend genau flächengetreu wiedergegeben; der Flächeninhalt des Kopfes kann durch Planimetrie nicht mehr erfaßt werden; das erübrigt sich auch, da die Beobachtung des Beugungsbildes eine Aussage über das $a \cdot \Delta n$ seines Flächeninhaltes macht.

In der Abb. 5 ist die errechnete Darstellung der Abb. 4 in unscharfer Form und mit harter Tonwiedergabe reproduziert; sie ist der vergrößerten

Svenssonaufnahme der Proteinlösung von Abb. 3 gegenübergestellt. Man erkennt die Parallele bis in alle Einzelheiten.

Für die Auswertung von *Svenssonaufnahmen* ergeben sich folgende Gesichtspunkte: die Konzentrationsgradientenkurve kann bis auf die Gipfel und Täler durch Planimetrieren der Kurve maximaler Helligkeit genau ausgewertet werden. Der Flächeninhalt der Gipfel und Täler ergibt sich aus der Beobachtung der Beugungsbilder, die das $a \cdot \Delta n$ des nicht vermeßbaren Teiles exakt erfassen lassen. Die Beobachtung mit monochromatischem Licht ist der Beobachtung mit weißem Licht vor-

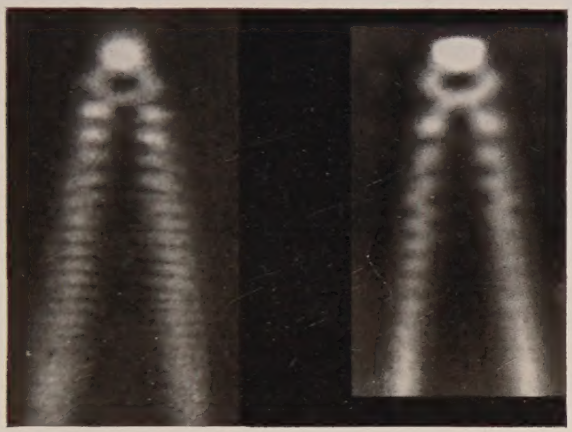


Abb. 5. Links: Vergrößerte Wiedergabe des Albumingipfels von Abb. 3. Rechts: Die errechnete Darstellung der Abb. 5 ist unscharf und mit harter Tonwiedergabe reproduziert.

zuziehen, da bei weißem Licht die Beugungsbilder verschmiert werden und die Grenzen des planimetrisch sicher auswertbaren Teiles der Kurven nicht exakt festgelegt werden können. Die Verwendung von keilförmigen oder keilförmig begrenzten Spalten[2, 9] ist abzulehnen, obwohl sie die Breite der „Null-Linie" herabdrücken. Durch ihre Verwendung werden kleine Gipfel in der Nähe der Null-Linie als schmale unvermeßbare Striche wiedergegeben; außerdem erhalten die Fußpunkte der Albumin- und γ-Globulingipfel eine derart verschwommene Breite und werden derart lichtschwach, daß diese wichtigen Teile der *Svenssonkurve* nicht mehr mit Sicherheit ausgewertet werden können. Es ist zu bedenken, daß die Reduktion der Null-Linie und die Beugungsbreite der *Svenssonlinie* einander reziprok sind, daß man mithin sehr breite Beugungsbilder in Kauf nehmen muß, wenn man die Null-Linie reduziert. Eine derartige Reduktion ist außerdem überflüssig, da die Vermeßbarkeit einer Linie nicht von ihrer Breite abhängt, sondern von der Schärfe, mit der ihre Ränder wiedergegeben sind[10]; diese Schärfe wird durch einen Keil- oder

Spindelspalt nicht verbessert; es wird lediglich der Austritt der Kurve aus der Null-Linie verschlechtert.

Unter Berücksichtigung dieser Kautelen ergibt sich, daß die *Svensson*-kurven — entsprechend der allgemeinen Empfindlichkeitsgrenze des *Toepler*verfahrens auf $a \cdot \Delta n = \pm 0{,}5\,\lambda$ ausmeßbar sind; das entspricht einem sicher erfaßbaren Konzentrationsunterschied in der Lösung $\Delta c \cdot a = = 0{,}03\%$ Protein.

Bei der elektrophoretischen Untersuchung wird meist eine 1,5%ige Proteinlösung verwendet. Die Makroelektrophorese benutzt Zellen von 2,5 cm Tiefe; hier resultiert eine Meßsicherheit von 0,012% Protein; das ist, bezogen auf die 1,5%ige Proteinlösung, eine *R-U*-Sicherheit von 0,8%; die *R-U*-Werte haben demnach einen optisch bedingten Fehler von $\pm$ 0,4%. Es braucht nicht betont zu werden, daß hier nur *eine* Fehlermöglichkeit der Gesamtuntersuchung diskutiert wurde. Bei der Mikroelektrophorese, die eine 0,5 cm tiefe Meßzelle benutzt, liegt der Fehler dementsprechend bei $\pm$ 2%.

Da die Methoden nach *Svensson*, *Lamm* und *Longworth* Modifikationen des gleichen *Toepler*schen Schlierenprinzips sind, so haben diese Verfahren in optimaler Anordnung auch den gleichen Meßfehler, der ein $a \cdot \Delta n < 1\,\lambda$ nicht mehr mit Sicherheit erkennen läßt; es ist hierbei gleichgültig, ob es sich um ein $a \cdot \Delta n$ handelt, das durch ein großes dn/dx und entsprechend kleine Δx verursacht wird, oder um ein kleines dn/dx, das sich über ein großes Δx hinzieht; in dem einen Fall kann der Spalt IV sehr weit gewählt werden, in dem anderen Fall muß er sehr eng eingestellt werden.

Die Verfahren nach *Philpot* und *Longworth* messen statt der Linie maximaler Helligkeit die Übergangslinie zwischen einem hellen und einem dunklen Feld. Hierdurch erreichen sie bei photographischer Auswertung nicht die Empfindlichkeit der übrigen Verfahren, da diese Übergangslinie je nach den photographischen Bedingungen unterschiedliche Lagen annehmen kann.

B. Die Interferenzverfahren.

Die Interferenzverfahren messen den Brechungsunterschied zu einer Vergleichslösung direkt; sie werden mit monochromatischem Licht und weißem Licht angewendet. Bei diesem Verfahren ist das weiße Licht — im Gegensatz zu seiner Verwendung bei der Schlierenmethode — dem monochromatischen Licht weit überlegen, weil es eine fast um zwei Zehnerpotenzen höhere Meßempfindlichkeit gibt.

1. Das monochromatische Interferenzverfahren.

Die Empfindlichkeit des monochromatischen Interferenzverfahrens wurde von *Hansen* (l. c.) diskutiert; er gibt ein Auflösungsvermögen von $\pm$ 0,25 λ an; dieser Wert wird durch die Erfahrung bestätigt.

Wenn die Küvette nach *Labhard* und *Staub*[6] im monochromatischen Licht mit einem zweiten kohärenten Lichtstrahl interferierend abgebildet wird, so beobachtet man helle Stellen, wo in der Küvette $a \cdot \Delta N = (m \pm \sim 0{,}25)\,\lambda$ beträgt, wenn m eine ganze Zahl beträgt; dunkle Stellen werden dort beobachtet, wo $a \cdot \Delta n = \left(m \begin{smallmatrix} + \sim 0{,}75 \\ + \sim 0{,}25 \end{smallmatrix}\right) \cdot \lambda$ ist.

Zur Beurteilung der Meßempfindlichkeit muß berücksichtigt werden, daß mindestens ein Helligkeitsmaximum oder ein Helligkeitsminimum sicher erkennbar sein müssen; hierzu ist ein $a \cdot \Delta n > 0{,}5$ erforderlich. Dies entspricht einer Konzentrationsdifferenz von 0,02% Protein.

In einem beliebigen Punkt der Zelle kann $a \cdot \Delta n$ mit einer Sicherheit von $\pm 0{,}4\,\lambda$ festgelegt werden. Das entspricht bei einer 0,5 cm tiefen Küvette einem Meßfehler von $\pm 1{,}2\%$ bezogen auf die 1,5%ige Meßlösung. (Es muß hier berücksichtigt werden, daß der Übergang des hellen in den dunklen Streifen je nach Belichtung, Entwicklung und Gradation der Platte unterschiedliche Lage zeigt und um $\pm 0{,}2\,\lambda$ streuen kann.)

Von *Lotmar*[7] ist die Jaminanordnung von *Labhard* und *Staub* durch die *Michelson*sche Interferenzanordnung in eleganter Art ersetzt worden. Hierdurch wird einmal erreicht, daß die Interferenzlinien im Bildort scharf erscheinen (s. *Hansen* l. c.) und, daß zweitens der Lichtstrahl nach einer Spiegelung die Küvette zweimal passiert. Hierdurch wird die effektive Küvettengröße verdoppelt und ein halb so großer *R-U*-Fehler erreicht. Das ist bei der Bestimmung der Diffusionskonstanten sehr angenehm; bei der quantitativen Elektrophorese muß eine stark herabgesetzte Trennschärfe in Kauf genommen werden, weil der reflektierte Lichtstrahl durch seine Brechung in der Küvette beim zweiten Passieren nach der Reflexion nicht mehr dieselbe brechende Stelle trifft. Die Trennschärfe einer Anordnung nimmt mit zunehmender Küvettentiefe ab; bei einer Spiegelung kommt hierzu noch der schädliche Weg zwischen Küvette und Spiegel, der doppelt in Erscheinung tritt. Die Fehler, die durch Spiegelung entstehen, sind bei *Svensson*[2] eingehend diskutiert.

2. Die Interferenz mit weißem Licht.

Es ist bereits früher bei Beobachtungen der Diffusionsschicht an einem kathodisch polarisierten Quecksilbertropfen darauf hingewiesen worden[11], daß die Interferenzbeobachtung mit weißem Licht jedem anderen Meßverfahren an Empfindlichkeit weit überlegen ist.

Dieses Meßverfahren wird bei der Mikroelektrophorese und der Mikrodiffusion[5] derart angewendet, daß zwei kohärente Lichtstrahlen von $0{,}05 \cdot 0{,}005$ cm² Querschnitt die Meßzelle in ihrer Höhe abtasten und daß der Brechungsunterschied an Meßstellen gegenüber einer Vergleichslösung durch die meßbare Verstellung eines Jaminprismas kompensiert wird.

Die Abb. 6 zeigt die Meßanordnung und die Abb. 7 zeigt die Meßzellen. Der Lichtstrahl der weißen Lichtquelle *a* trifft das Jaminprisma *b* und wird dort durch Reflexion an Vorder- und Rückseite in zwei kohärente Strahlen gespalten. Beide Strahlen passieren die Zelle *c* durch den Meßkanal und einen Vergleichskanal; sie kommen dann über das drehbare Prisma *d*, das sie vereinigt, zur Beobachtungsebene. Im Beobachtungsfeld sieht man ein farbiges Interferenzbild, das markante Farbübergänge von Rot nach Blau und Rot nach Grün zeigt. Wenn einer dieser Farbübergänge durch Drehen der Meßtrommel *e* in die Mitte des Gesichtsfeldes gebracht ist, so wandert er aus, wenn sich in der Küvette die Brechungszahl ändert. Durch

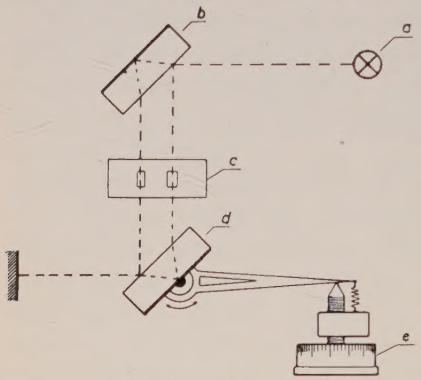


Abb. 6. *Meßanordnung* für die Interferenzbeobachtung mit weißem Licht.

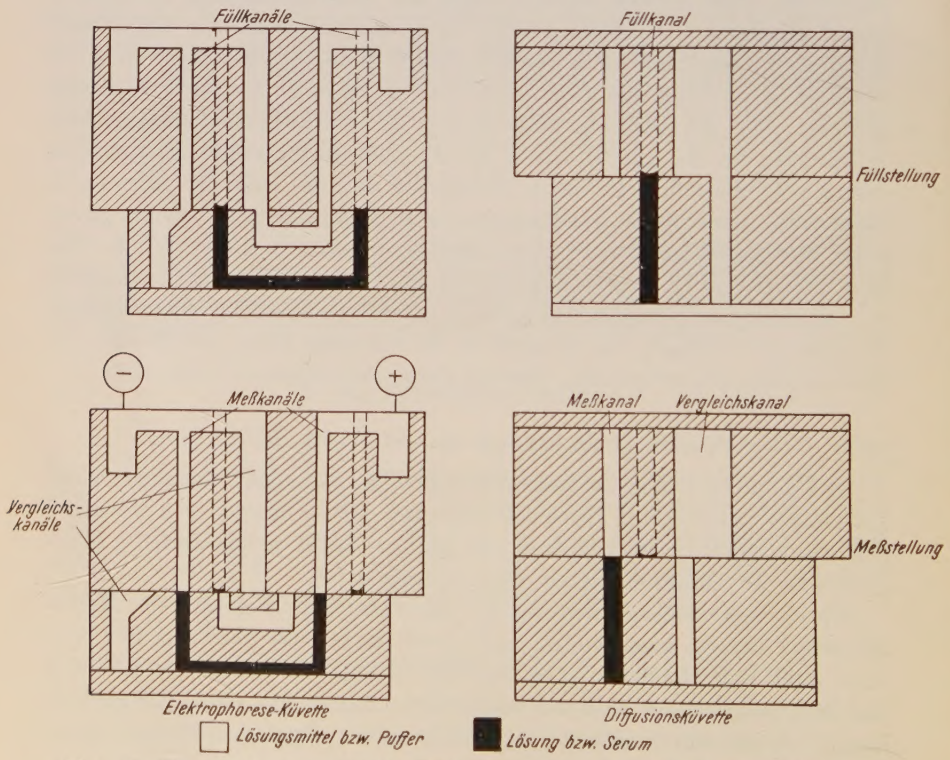


Abb. 7. Die *Meßzellen* für die quantitative Elektrophorese und für die Diffusionskonstantenmessung.

Neueinstellen der Meßtrommel kann er wieder in die Mitte zurückgeholt werden und diese Verstellung der Meßtrommel ist direkt proportional dem Unterschied der Brechungszahl und somit der Konzentration.

Die Brechungsdifferenz zwischen Meßlösung und Vergleichslösung kann auf $a \cdot \Delta n = \pm 0{,}01\ \lambda$ genau gemessen werden. Das entspricht bei einer Küvettentiefe von 0,5 cm einem Auflösungsvermögen von 0,0013% Protein und einem Meßfehler von $\pm$ 0,04 bezogen auf die 1,5%ige Proteinlösung. Bei Routineuntersuchungen der Elektrophorese, bei der nicht mit voller Empfindlichkeit gearbeitet wird, wird $a \cdot \Delta n$ mit einem $\sigma = \pm 0{,}018\ \lambda$ eingestellt; diesem Einstellfehler entspricht bei einer 1,5%igen Proteinlösung ein *R-U*-Fehler von $\pm$ 0,08% für die Einzelmessung.

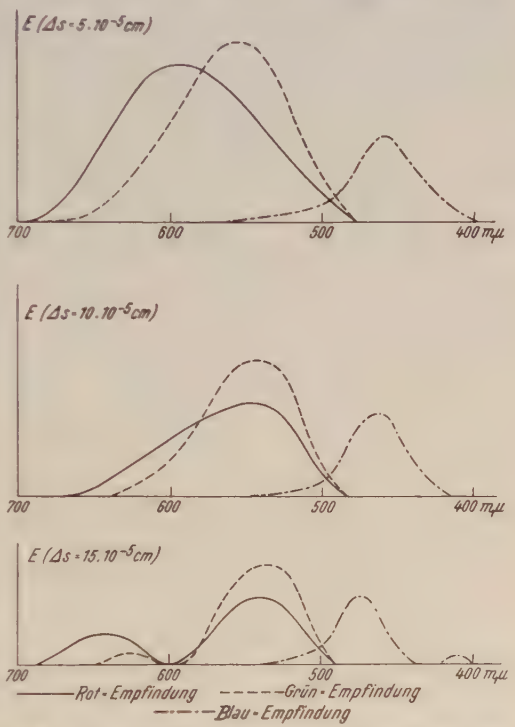


Abb. 8. Die *Reizwerte* in Abhängigkeit von der *Wellenlänge* für einen Wegunterschied der kohärenten Lichtstrahlen von 5 (10; 15) . 10^{-5} cm.

Diese hohe Empfindlichkeit wird durch das Heranziehen der Farbempfindlichkeit des Auges erreicht; an bestimmten Stellen des Interferenzspektrums empfindet das Auge einen Gangunterschied der kohärenten Strahlen von weniger als $5 \cdot 10^{-7}$ cm als deutlichen Farbunterschied. An diesen Stellen liegen die Intensitätsminima des weißen Lichtes. *Fraunhofer* bestimmte hieraus die „Wellenlänge" des weißen Lichtes zu 571 mμ; eigene Messungen zeigen, daß bei künstlichem Licht eine „Wellenlänge" von rund 590 mμ gemessen wird. Es können mithin ohne merkbaren Fehler für Interferenz mit weißem Licht die Brechungszahlen für das Natriumlicht übernommen werden.

Es wurde versucht, diese vom Auge empfundenen Farbunterschiede in Abhängigkeit vom Gangunterschied der kohärenten Lichtstrahlen rechnerisch zu erfassen. Die Grundempfindungskurve nach

*König** wurde auf die Intensitätsverteilung eines schwarzen Strahlers von 2700° umgerechnet und für jeden Gangunterschied bis $3 \cdot 10^{-4}$ cm der Reizwert für die Spektralfarben festgelegt.

Die Abb. 8 zeigt die Reizwerte in Abhängigkeit von der Wellenlänge für einen Gangunterschied von 5.10^{-5} (10.10^{-5} und 15.10^{-5}) cm. Das Auge wird bei dem Gangunterschied von 5 (10 und 15) $\cdot 10^{-5}$ cm im Rotanteil mit der Intensität 12 (5 und 4)**, im Grünanteil mit der Intensität 11 (7 und 5) und im Blauanteil mit der Intensität 4 (3 und 2) gereizt. Hieraus resultiert, daß das Auge bei einem Gangunterschied von 5.10^{-5} cm ein

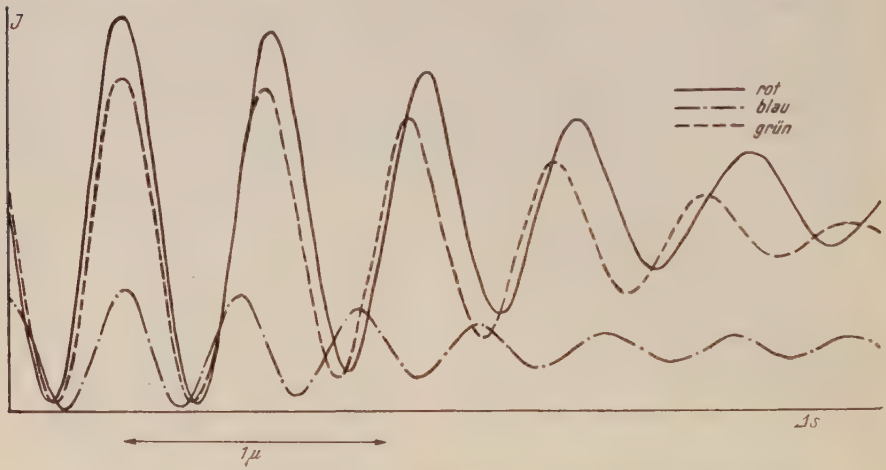


Abb. 9. Die *Reizwerte* in Abhängigkeit vom *Wegunterschied* der kohärenten Lichtstrahlen.

Gelb mit der Intensität 14 und ein Rot mit der Intensität 1 und einen Weißgehalt der Intensität 12 empfindet; es sieht mithin ein leicht rötlich getöntes Gelb. Ein Blaugrün, mit einer Tönung zum Grünen hin, sieht das Auge bei einem Gangunterschied von 10.10^{-5} cm und ein Blaugrün, mit einer Tönung zum Blauen hin, sieht das Auge bei dem Gangunterschied von 15.10^{-5} cm. Der Weißgehalt der Farben schwankt zwischen 45 und 60%.

In der obenstehenden Abb. 9 sind die einzelnen Reizwerte in Abhängigkeit vom Gangunterschied dargestellt, so daß sich aus der Kurve für jeden Gangunterschied bis zu 3.10^{-4} cm Farbe und Weißgehalt angeben lassen.

Die Farbe, die das Auge empfindet, ist in Abhängigkeit zum Gangunterschied in Abb. 10 (oben) eingetragen; man erkennt, daß bei einem

* Wenn statt der *König*schen Grundempfindungskurve die Reizwerte der Internationalen Beleuchtungstechnischen Kommission (I. B. K.) zugrunde gelegt werden, so ändern sich die resultierenden Kurven unwesentlich.

** Willkürliche Einheiten.

Gangunterschied von 3 (9; 15 und 21) · 10^{-5} cm die Farbe am schärfsten umschlägt. An diesen Stellen liegen die Minima für die „Wellenlänge" des weißen Lichtes. Bei 3 . 10^{-5} cm liegt der „schwarze Streifen" des Interferenzspektrums; der Farbumschlag bei 15 . 10^{-5} cm läßt sich am sichersten als Nullpunktstreifen einstellen; wenn sich hier die Wegdifferenz um 1 . 10^{-6} cm ändert, so sieht das Auge statt eines deutlich rot getönten Gelb ein deutlich grün getöntes Gelb. Die Erfahrung zeigt, daß

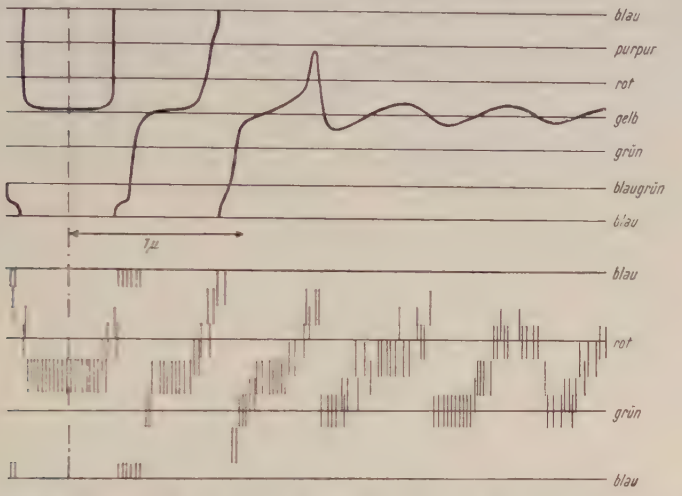


Abb. 10. *Die Farbempfindungen des Auges* in Abhängigkeit vom *Wegunterschied* der kohärenten Lichtstrahlen. Oben: Aus der Grundempfindung für einen Strahler von 2700° errechnete Kurve. Unten: Farbangaben der Beobachter am Interferometer.

auch farbenschwache Beobachter exakt einstellen können; sie empfinden die schärfsten Farbumschläge nur bei anderen Wegdifferenzen für die kohärenten Strahlen.

Um diese Berechnung der Farbempfindung auf ihre Richtigkeit zu prüfen, wurde von drei unbefangenen Beobachtern für unterschiedlich und unabhängig eingestellte Wegdifferenzen die Farbe angegeben. Abb. 10 (unten) zeigt das Ergebnis, nachdem die vom Beobachter benannte Farbe als senkrechter Strich in das Diagramm eingetragen wurde. Man erkennt im Vergleich beider Kurven eine gute Übereinstimmung zwischen Beobachtung und Rechnung; die Farben werden von den Beobachtern ausgeprägter wiedergegeben als es der Rechnung entspricht; dies liegt wahrscheinlich nicht an der subjektiven Farbangabe der Beobachter, sondern daran, daß die Rechnung nur genähert durchgeführt wurde und daß diese erste Näherung für Wegdifferenzen, die größer als 2 . 10^{-4} cm sind, nicht mehr ausreichend genau ist.

Eine Übersicht über die optischen Meßgrenzen gibt die Tabelle:

Verfahren	*Ausführung* a = Küvettentiefe	*Autor*	Kleinster, mit Sicherheit nachweisbarer *Brechungsunterschied* $a \cdot \Delta n$		Kleinster, mit Sicherheit nachweisbarer *Konzentrationsunterschied* einer Proteinlösung	Optischer *R-U-Fehler* bei der Elektrophorese einer 1,5%igen Proteinlösung
			in λ	in 10^{-6} cm		
*Toepler*sches Schlierenverfahren	Makro ($a = 2{,}5$ cm)	*Lamm, Svensson, Philpot, Longworth*	1	50	0,012%	± 0,4%
	Mikro ($a = 0{,}5$ cm)				0,06%	± 2%
Interferenz	monochromatisches Licht ($a = 0{,}5$ cm)	*Labhard* und *Staub*	0,6	30	0,04%	± 1,2%
	weißes Licht ($a = 0{,}5$ cm)	*Antweiler*	0,02	1	0,001%	± 0,04%

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß bei dem *Svenssons*chen Verfahren zur Aufzeichnung der Brechungsgradientenkurve in einer Meßzelle mit der Tiefe a mit Sicherheit ein Brechungsunterschied $a \cdot \Delta n = 1\,\lambda$ nachgewiesen werden kann. Da diese Empfindlichkeit allgemein die Grenzempfindlichkeit der Modifikationen des *Toepler*schen Schlierenverfahrens sind, haben auch die Verfahren nach *Lamm*, *Longworth* und *Philpot* das gleiche Auflösungsvermögen. Es wird ein *Svenssons*diagramm, dessen Helligkeitsverteilung errechnet wurde, einem experimentell gefundenen gegenübergestellt.

Das monochromatische Interferenzverfahren nach *Labhard* und *Staub* hat praktisch die gleiche Empfindlichkeitsgrenze. Die Modifikation nach *Lotmar* gibt zwar die doppelte Empfindlichkeit, aber weniger als die halbe Trennschärfe; dies ist für Diffusionsmessungen günstig, es erschwert aber elektrophoretische Analysen.

Das Interferenzverfahren mit weißem Licht weist mit Sicherheit einen Brechungsunterschied $a \cdot \Delta n = 0{,}02\,\lambda$ nach, weil die Farbenempfindlichkeit des Auges bei der Messung ausgenützt wird.

Die aus der Grundempfindungskurve des Auges für einen schwarzen Strahler von 2700° errechnete Farbempfindung des Auges in Abhängigkeit von der Wegdifferenz der kohärenten Lichtstrahlen wird der beobachteten Farbempfindung beim Interferometer mit weißem Licht gegenübergestellt.

Summary.

It was shown that a refractive difference $a\,\Delta n = 1\,\lambda$ can be detected in the *Svensson* procedure for tracing the refraction gradient curve in a measuring cell whose depth is (a). Since this sensitivity in general represents the limiting

sensitivity of the modifications of the *Toepler* striation method, the procedures of *Lamm* and *Longworth* and *Philpot* have the same resolving power. A *Svensson* diagram, whose luminosity distribution was computed, was compared with one that had been found experimentally.

The monochromatic interference method of *Labhard* and *Staub* has practically the same sensitivity limit. The *Lotmar* modification yields doubled the sensitivity, but less than half the resolving sharpness. This is favorable for diffusion measurements, but it makes electrophoretic analyses more difficult.

The interference method with white light reveals with certainty a refraction difference $a\,\Delta n = 0.02\ \lambda$, because the color sensitivity of the eye is used in the measurement.

A comparison is made of the color sensitivity of the eye in dependence on the path difference of the coherent light rays and calculated from the basic sensitivity of the eye for a black radiator of 2700°, and the observed color perception with the interferometer with white light.

The table gives a review of the optical measurement limits.

Résumé.

On montre que l'on peut rechercher avec certitude une différence de réfraction $a\,\Delta n = 1\ \lambda$ par le procédé de *Svensson* pour l'enregistrement de la courbe du gradient de réfraction dans une cuve de mesure de profondeur (a). De même que cette sensibilité est généralement la sensibilité limite du procédé modifié d'après *Toepler*, les procédés d'après *Lamm*, *Longworth* et *Philpot* présentent aussi le même pouvoir de dispersion. On a comparé un diagramme de *Svensson* dont on a calculé la répartition de la transparence vis-à-vis d'un diagramme trouvé expérimentalement.

Le procédé d'interférences monochromatiques d'après *Labhard* et *Staub* a pratiquement la même limite de sensibilité. La modification d'après *Lotmar* donne réellement une sensibilité double, mais, moindre que la moitié de la netteté des limites. Cela est favorable aux mesures de diffusion, mais rend les analyses par électrophorèse plus difficiles.

Le procédé d'interférence avec la lumière blanche recherche avec certitude une différence de réfraction $a\,\Delta n = 0{,}02\ \lambda$, parce que dans la mesure, on tire tout le parti possible de la sensibilité de l'oeil vis-à-vis des couleurs.

La sensibilité de l'oeil à la couleur, calculée par rapport à la différence des chemins des rayons lumineux cohérents, à partir de la courbe de sensibilité de l'oeil pour un corps noir à 2700°, est opposée à la sensibilité aux couleurs observée avec un interféromètre à lumière blanche.

Le tableau donne une vue d'ensemble des limites des mesures optiques.

Literatur.

[1] *O. Lamm*, Z. physik. Chem. A **138**, 313 (1928).
[2] *H. Svensson*, Kolloid-Z. **87**, 181 (1939); **90**, 141 (1940); Ark. Kemi, Mineral. Geol. **22** A, 10 (1946).
[3] *L. G. Longworth*, J. Amer. Chem. Soc. **61**, 529 (1939).
[4] *J. S. L. Philpot*, Nature **141**, 283 (1938).
[5] *H. J. Antweiler*, Z. angew. Chem. **59**, 33 (1947); Kolloid-Z. **115**, 130 (1949).
[6] *H. Labhard*, *H. Staub*, Helv. Chim. Acta **30**, 1954 (1947).
[7] *W. Lotmar*, Z. angew. Chem. **62**, 24 (1950).
[8] *G. Hansen*, Zeiß Nachrichten **3**, 302 (1940).
[9] *E. Wiedemann*, Helv. Chim. Acta **30**, 648 (1947).
[10] *H. Kaiser*, Archiv für technisches Messen J 031—2 (1934).
[11] *H. J. Antweiler*, Z. Elektrochemie **44**, 719 (1938).

Chemisches Institut, Wissenschaftliche Fakultät der Universität Tokio.

Aufnahme von Raman-Spektren mit geringen Substanzmengen.

Von

San-ichiro Mizushima, Takehiko Shimanouchi und **Tadao Sugita.**

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

Um Ramanspektren mit geringen Substanzmengen aufnehmen zu können, haben wir ein Versuchsgefäß entwickelt, das im folgenden beschrieben werden soll. Es gelang dabei, mit Flüssigkeitsmengen unter 1 ml zu arbeiten und dabei auch Polarisationsmessungen auszuführen.

Man denke sich den Spektralapparat von „verkehrtem Strahlengang" durchsetzt (Licht tritt durch den Spalt aus dem Kollimator) und den Spalt S mittels einer Linse L etwa im Verhältnis 1 : 2 in B abgebildet (Abb. 1). Dann soll der B umgebende Lichtkegel vom Ramangefäß gerade umschlossen werden.

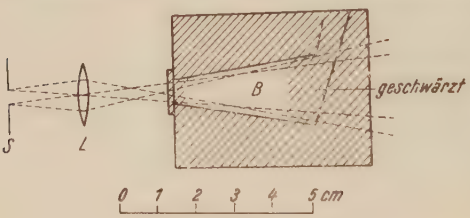


Abb. 1. Das Versuchsgefäß.

Hierzu wird eine rechteckige Glasplatte passender Stärke parallel zum oberen und unteren Begrenzungsstrahl ausgeschnitten, wobei die rückwärtige Abgrenzung wie üblich zwecks Vermeidung störender Reflexionen schräg aufwärts und in die Füllöffnung übergeführt wird. Diese ausgeschnittene Glasplatte wird zwischen zwei gleich große, volle Glasplatten gekittet und stirnseitig durch ein Glasplättchen verschlossen. Der in der Abbildung nicht schraffierte Bereich um B bleibt beiderseits hell, alles andere wird geschwärzt. Dieses Gefäß wird nun dicht vor die Quecksilberlampe gestellt und das hindurchtretende Licht mittels Spiegel in das Gefäß zurückreflektiert.

Auf diese Weise konnten mit Flüssigkeitsmengen unter 1 ml vollkommen saubere Ramanspektren erhalten werden. Ferner läßt sich das Versuchsgefäß horizontal gemäß Abb. 2 unterteilen, so daß zwecks einfachen Vergleiches die Ramanspektren zweier verschiedener Flüssigkeiten dicht übereinander auf derselben Platte und gleichzeitig aufgenommen werden können.

Den Polarisationszustand der Ramanlinien kann man bestimmen indem man vor das Gefäß ein geteiltes Polaroidfilter setzt, so zwar, daß, in den einen Teil des Gefäßes nur parallel zur Spektrographenachse, in den anderen nur senkrecht dazu schwingendes Erregerlicht treten kann.

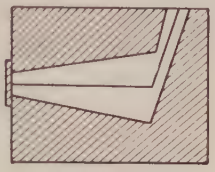


Abb. 2. Das Versuchsgefäß in zwei Teile geteilt.

Zusammenfassung.

Es wird ein Gefäß beschrieben, mit dessen Hilfe Ramanspektren unter Verwendung von nur 1 ml Flüssigkeit aufgenommen werden können. Die Unterteilung dieses Gefäßes gestattet die gleichzeitige Untersuchung zweier verschiedener Flüssigkeiten zu Vergleichszwecken. Durch Anwendung eines geteilten Polaroidfilters ist auch die Bestimmung des Polarisationszustandes der Ramanlinien möglich.

Summary.

A vessel is described, with whose aid it is possible to take Raman spectra with the use of only 1 ml of liquid. The division of this container permits the simultaneous study of two different liquids for comparison purposes. Through the use of a divided polaroid filter, it is also possible to determine the polarization state of the Raman lines.

Résumé.

On décrit un récipient servant à prendre le spectre Raman avec 1 ml de liquide seulement. Le cloisonnement de ce récipient permet l'observation simultanée de deux liquides différents dans un but de comparaison. Par emploi d'un filtre polaroïd fractionné, on peut établir l'état de polarisation des raies Raman.

Istituto di Merceologia dell'Università, Bologna.

Der Einfluß des Lösungsmittels auf das Absorptionsspektrum des Indigos.

Von

Giorgio Nebbia.

Mit 6 Abbildungen.

(Eingelangt am 30. Mai 1950.)

Bei den Untersuchungen über den Einfluß des Lösungsmittels auf das Absorptionsspektrum gefärbter Substanzen suchte man die Ver-

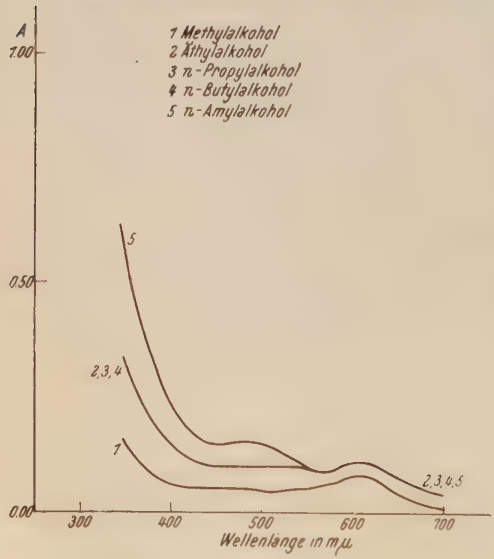


Abb. 1.

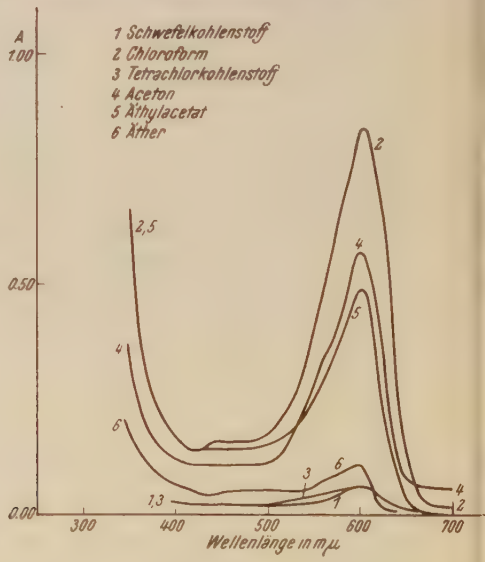


Abb. 2.

schiebung des Absorptionsmaximums als Funktion der Dielektrizitätskonstante, des Refraktionsindex oder des Dipolmomentes des Lösungsmittels zu deuten, um daraus eine durch das Lösungsmittel hervor-

gerufene Deformation des Moleküls der untersuchten Substanz abzuleiten.

Derartige Untersuchungen haben zu keinerlei schlüssigen Resultaten geführt, und die Schlußfolgerungen, die das Bestehen einer Resonanz der gefärbten Verbindung stützen sollten, sind von keinem chemischen oder physikalischen Interesse.

Die bei derartigen Untersuchungen in Betracht gezogenen Parameter sind nie vollständig und es kann als sehr wahrscheinlich angenommen werden, daß sich sehr viele Effekte überlagern.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Absorptionsspektren des Indigos in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Eine ähnliche Untersuchung ist schon früher[1] durchgeführt worden, doch wurden an dieser Stelle nur die Absorptionsmaxima wiedergegeben.

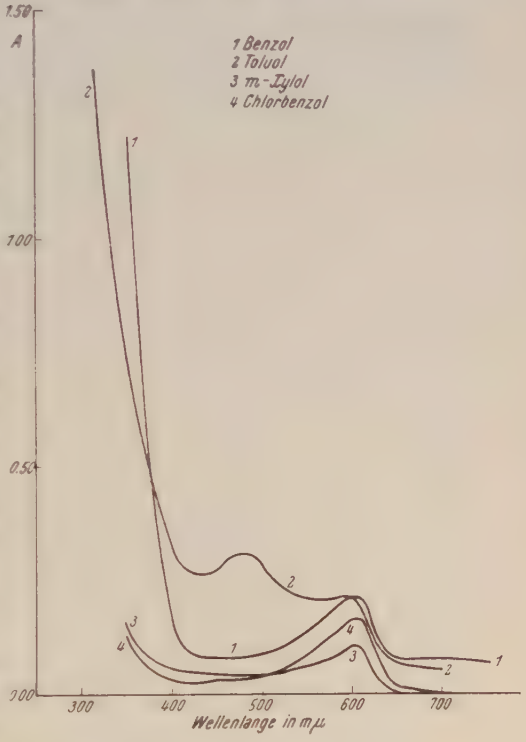


Abb. 3.

Da, wie bekannt, Indigo in den meisten Lösungsmitteln nur sehr wenig löslich ist, wurden dessen gesättigte Lösungen mit dem Spektralphotometer von *Beckmann* untersucht. Dieses Instrument erlaubt die Messung auch sehr kleiner Absorptionen mit relativ hoher Genauigkeit, und so war es auch möglich, die Löslichkeit von Indigo in den verschiedenen Lösungsmitteln festzulegen.

Im Sichtbaren wurden zwei Absorptionsbanden festgestellt: Die eine zwischen 450 und 500 mμ, die für die Lösungsmittel mit aliphatischen Gruppen gemeinsam war, und eine zwischen 575 und 625 mμ, die allen Lösungsmitteln und dem charakteristischen Dampfspektrum des Indigos gemeinsam ist.

Es war bisher nicht möglich, die physikalischen Eigenschaften des Lösungsmittels mit dem Absorptionsmaximum in eine quantitative Beziehung zu setzen. Aus den von uns durchgeführten Messungen glauben wir berechtigterweise den Schluß ziehen zu dürfen, daß die

Bande zwischen 450 und 500 mμ auf Polarisationseffekte zurückzuführen ist, welche durch Kohlenstoffatome mit tetraedrischer Symmetrie, die den Lösungsmitteln mit aliphatischen Ketten angehören, hervorgerufen werden.

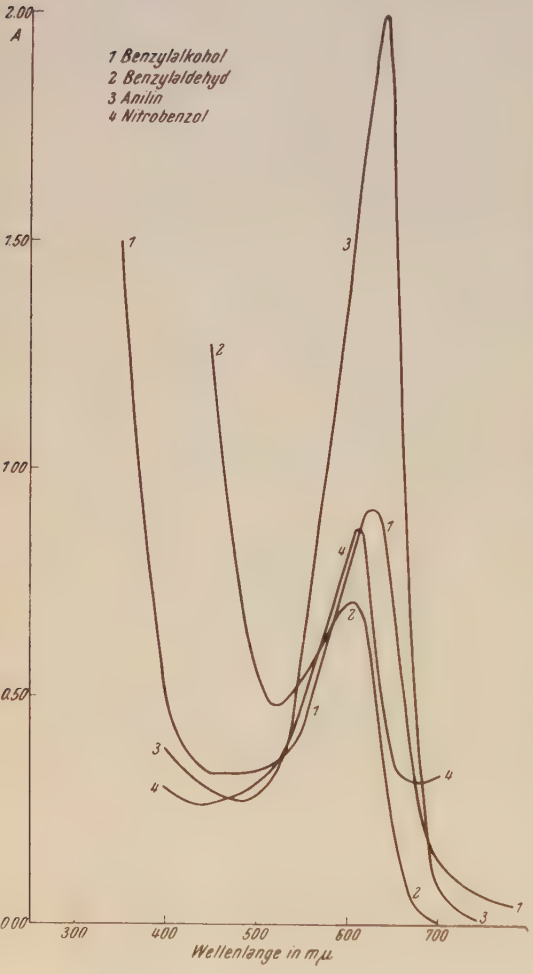


Abb. 4.

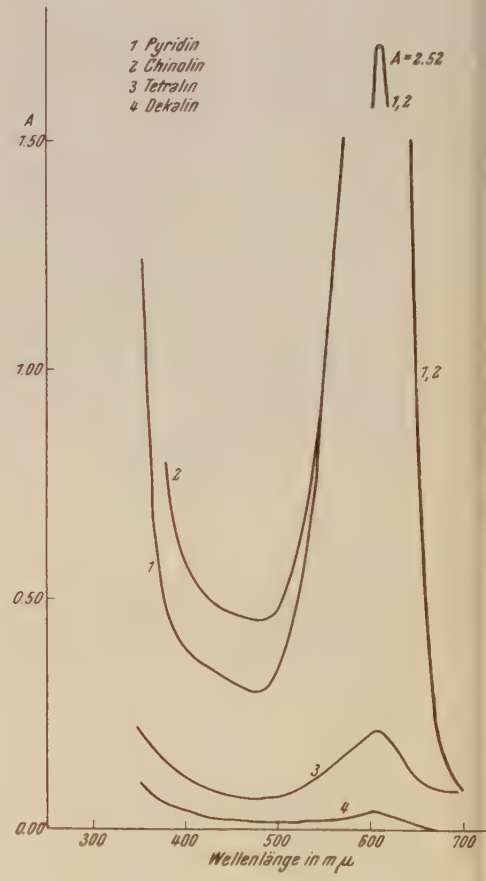


Abb. 5.

Die gesättigten Indigolösungen wurden hergestellt, indem zu 100 ml Lösungsmittel 0,1 g Indigo hinzugefügt wurde und mechanisch durch zwei Stunden geschüttelt wurde. Die Lösungen wurden für einen Tag sich selbst überlassen und dann durch ein Papierfilter mit den nötigen Vorsichtsmaßregeln, die ein Verdampfen der flüchtigen Lösungsmittel verhindern sollten, filtriert.

Die Absorptionskurven wurden mit einem Spektrophotometer von *Beckmann*, Modell D. U., aufgenommen.

Die Ergebnisse sind in den Abb. 1 bis 6 dargestellt, in welchen die Absorption als Funktion der Wellenlänge aufgetragen ist. In Abb. 6 ist die Absorption in Mischungen von Essigsäure und Wasser dargestellt. In diesen Mischungen hat sich Indigo genügend löslich gezeigt,

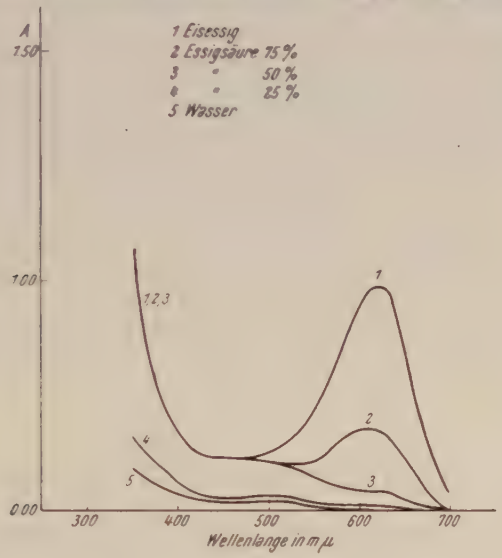


Abb. 6.

um die Absorptionsmessungen im Violetten zu gestatten. Im Hexan war Indigo jedoch nur in einem für die Messungen ungenügenden Ausmaß löslich.

Zusammenfassung.

Es wurden die Absorptionsspektren in gesättigten Indigolösungen verschiedener Lösungsmittel untersucht. Es wurden zwei charakteristische Absorptionsbanden festgestellt.

Summary.

A study was made of the absorption spectra of saturated indigo solutions in various solvents. Two characteristic absorption bands were established.

Résumé.

On a expérimenté les spectres d'absorption des solutions saturées d'indigo dans divers dissolvants et repéré deux bandes d'absorption caractéristiques.

Literatur.

[1] *S. E. Sheppard* und *P. T. Newsome*, J. Amer. Chem. Soc. **64**, 2937 (1942).

Aus dem Institut für Mikrochemie und Geochemie der Technischen Hochschule Graz.

Die Bestimmung kleinster Manganmengen mit Arnolds Reagens.

Von

Wilhelm Prodinger*.

(Experimentell mitbearbeitet von *Almut Gurski*.)

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

Bei der Suche nach einem Mangannachweis, der noch 0,001 γ Mangan in 10 ml erfassen mußte, stießen wir auf die von *Trillat*[1] angegebene Reaktion höherwertiger Manganverbindungen mit p,p′-Tetramethyldiaminodiphenylmethan, das unter Bildung eines blauen Farbstoffes katalytisch oxydiert wird.

Nach den Angaben in den Tabellen der Reagenzien für anorganische Analyse der „Internationalen Kommission für neue analytische Reagenzien und Reaktionen" der „Union Internationale de Chimie" läßt sich mit dieser Reaktion noch 0,001 γ Mangan in 0,03 ml sicher nachweisen.

Tillmans und *Mildner*[2] benützten die von ihnen modifizierte Reaktion zum qualitativen Nachweis geringer Manganmengen in Wässern.

R. G. Harry[3] warnt wegen des bisher noch nicht eingehend studierten Chemismus der Reaktion vor einer bedenkenlosen Anwendung derselben.

Wir haben es uns daher zur Aufgabe gestellt, die Reaktion eingehend zu untersuchen und besonders festzustellen, ob die Reaktion durch Kupfer, Kobalt und Eisen gestört wird.

Was die Grundlage der Reaktion anlangt, hat man sich vorzustellen, daß in erster Phase das p-p′-Tetramethyldiaminodiphenylmethan zum entsprechenden p-p′-Tetramethyldiaminobenzhydrol oxydiert wird, von dem bekannt ist[4], daß es sich mit primären, sekundären und tertiären aromatischen Aminen zu Leukokörpern von Farbstoffen

* Derzeit Wien-Mödling, Badstraße 29.

der Triphenylmethanreihe kondensieren läßt, die durch Oxydation leicht in diese Farbstoffe überführbar sind.

Man wird sich also vorstellen müssen, daß die Wirkung der höherwertigen Manganverbindungen einerseits in der Oxydation des Reagens zum Benzhydrol $(CH_3)_2N \cdot C_6H_4—CH_2—C_6H_4 \cdot N(CH_3)_2 \rightarrow (CH_3)_2N \cdot C_6H_4—CH(OH)—C_6H_4 \cdot N(CH_3)_2$, anderseits in der Oxydation des aus dem Benzhydrol und überschüssigem Reagens entstandenen Leukokörpers zum Farbstoff besteht. Bei dem komplexen Charakter der Reaktion war von vornherein nicht zu erwarten, daß das *Lambert-Beer*sche Gesetz streng erfüllt sei, was sich auch bei unseren Untersuchungen erwiesen hat. Trotzdem ist die Reaktion, wie die Eichkurve zeigt, zur quantitativen Bestimmung von 5 γ bis 30 γ Mangan pro 100 ml geeignet.

Der qualitative Mangannachweis wurde von *Tillmans* und *Mildner* mit einer Lösung der Base in Chloroform durchgeführt, wir zogen jedoch, um in homogener Phase arbeiten zu können, die Verwendung einer 2% igen Lösung der Base in 2 n-Essigsäure vor.

Außerdem erschien die Anwendung von Essigsäure schon deshalb empfehlenswert, weil vom Leuko-auramin

$$(CH_3)_2N \cdot C_6H_4—\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}—C_6H_4 \cdot N(CH_3)_2$$

bekannt ist, daß dessen Lösung in Salzsäure nach vorübergehender Grünfärbung *farblos ist*, während seine Lösung in Eisessig intensiv blau gefärbt ist.

Zur Oxydation des Mangans verwendeten wir wie *Tillmans* und *Mildner* eine gesättigte wäßrige Kaliumperjodatlösung, zur nachherigen Farbstoffbildung eine 2% ige Lösung der Base in 2 n-Essigsäure.

Die von uns eingehaltene Arbeitsweise war die folgende: 1 ml Manganlösung wurde in einem Berliner Porzellantiegel hoher Form mit 4 Mikrotropfen Kaliumperjodatlösung vermischt, hierauf mit einem Tropfen 2 n-Essigsäure angesäuert und zum Schluß mit 2 Tropfen Reagenslösung versetzt. Über die Ergebnisse unterrichtet Tabelle 1.

Wie schon *Tillmans* und *Mildner* fanden, wird die Reaktion durch geringe Mengen Eisen nicht gestört. Unsere Versuche ergaben die auffällige Tatsache, daß der störende Einfluß des Eisens nicht so sehr vom prozentualen Überschuß des Eisens, als vielmehr von der Konzentration des Eisens *und* des Mangans abhängt. So lassen sich z. B. 0,005 mg Mangan neben 0,005 mg Eisen noch ohne weiteres nachweisen, während 0,5 mg Mangan neben 0,5 mg Eisen nicht nachweisbar sind.

Für die praktische Ausführung des Nachweises sind diese Feststellungen insofern bedeutungslos, als man bei Vorliegen von Eisen

dieses am zweckmäßigsten durch Ausäthern der stark salzsauren Lösung entfernen wird.

Tabelle 1.

Gegeben Mn γ/ml	KJO_4-Lösung Tropfen	Reagens in Chloroform	Reagens in 2 n-Essigsäure
1000	1	Färbung tritt sofort auf	Färbung tritt sofort auf
	2	Färbung entsteht langsamer. Beständigkeit ungenügend	Färbung entsteht sofort, Intensität stärker als mit Chloroform, Beständigkeit gut
	3	Farbton unrein	Farbton rein. Leuchtendes Blau
	4	Färbung entsteht langsam. Farbton sehr unrein	Färbung entsteht sofort. Farbton tiefblau, Beständigkeit gut
100	1	Färbung verschwommen. Beständigkeit eben noch ausreichend	Färbung entsteht sofort. Leuchtendes Blau von guter Beständigkeit
	2	Intensität besser. Beständigkeit unzureichend	es entsteht sofort ein beständiges leuchtendes Blau
	3	das anfänglich entstehende tiefe Blau verschwindet nach einigen Sekunden	beständiges reines Blau
	4	unbeständig	kräftiges dunkles Blau von guter Beständigkeit
10	1	Färbung beständig	leuchtendes beständiges Blau
	2	unbeständig	beständig
	3	„	„
	4	tiefblau, unbeständig	sehr intensive, beständige Färbung
1	4	ungleichmäßig	gleichmäßige Färbung, Beständigkeit gut
0,1	4	gleichmäßig	gleichmäßig, erst nach Konzentrieren
0,01	4	erst nach Eindampfen	desgleichen
0,001	4	„ „ „	„

Wir versuchten anfänglich, das Eisen durch Phosphorsäure bzw. Dinatriumphosphat zu maskieren, doch führten diese Versuche zu keinem befriedigenden Ergebnis.

Wir konnten aber anderseits feststellen, daß der Nachweis auch in reinen Manganlösungen durch beide Reagenzien gestört wird.

Es war nun naheliegend, den Grund der Reaktionshemmung durch Dinatriumphosphat in der durch das Maskierungsmittel bewirkten Änderung des p_H-Wertes der Lösung zu suchen. Schon *Tillmans* und *Mildner* fanden, daß die Reaktion im alkalischen Gebiet nicht stattfindet. Auf Grund dieser Feststellung haben wir nur den p_H-Bereich 5 bis 1 untersucht und konnten dabei beobachten, daß die Reaktion lediglich bei $p_H = 3$ und $p_H = 4$ eintritt.

Der p_H-Wert 3 stellt sich auch ein, wenn man neutrale Manganlösungen mit den Reagensmengen versetzt, die nach Tabelle 1 die intensivste und beständigste Blaufärbung ergeben.

Durch diese Ergebnisse ist auch verständlich, daß und warum die bei den Versuchen zur Maskierung des Eisens zugesetzte Phosphorsäure bzw. das Dinatriumphosphat die Reaktion hemmen.

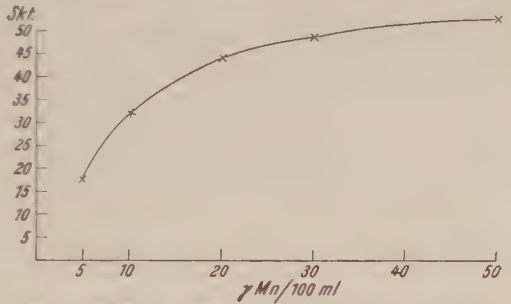


Abb. 1. Eichkurve mit dem lichtelektrischen Kolorimeter nach *Lange*.

Die oben erwähnte Ausätherung des Eisens führten wir in einem nach dem Prinzip von *Schacherl* konstruierten Apparat durch. Die Lösung wird mit 1 ml konz. Äthersalzsäure und 1 ml konz. Salzsäure versetzt und mit Äther erschöpfend extrahiert. In der vom Eisen befreiten stark salzsauren Lösung läßt sich der Mangannachweis nun nicht mehr durchführen, doch gelingt es leicht, durch Zufügen von Natriumacetat, unter Verwendung eines Universalindikatorpapiers den optimalen p_H-Wert von 3 einzustellen, in welcher Lösung der Nachweis in aller Schärfe zu erbringen ist.

Die kolorimetrische Bestimmung nahmen wir im lichtelektrischen Kolorimeter nach Dr. *Lange* vor. Gemessen wurde mit dem Gelbfilter GG 11 nach der Ausschlagsmethode in der 100-ml-Küvette.

Die Manganlösung wurde mit 0,4 ml gesättigter Kaliumperjodatlösung, 0,7 ml einer 2%igen Lösung der Base in 2 n-Essigsäure und mit 0,5 ml 2 n-Essigsäure versetzt, durchgemischt, auf 100 ml verdünnt und nach abermaligem Durchmischen kolorimetriert.

Zusammenfassung.

Die Farbreaktion des Mangans mit *Arnold*schem Reagens(p-p'-Tetramethyl-diaminodiphenylmethan) wurde eingehend studiert. Sie findet nur bei $p_H = 3$ bis 4 statt. Der störende Einfluß des Eisen(III)-Ions hängt nicht von dessen prozentualem Überschuß, sondern von der absoluten Konzentration des Eisens und des Mangans ab. Die Maskie-

rung des Eisens mit Phosphorsäure bzw. Dinatriumphosphat führt wegen der hierdurch verursachten p_H-Verschiebung nicht zum Ziel. Der Nachweis des Mangans in eisenhaltigen Lösungen kann nur nach Ausäthern des Eisens aus salzsaurer Lösung, die dann mittels Natriumacetat auf das p_H von etwa 3 abgepuffert wird, in eindeutiger Weise geführt werden. Die Erfassungsgrenze ist: 0,001 γ; die Grenzkonzentration: 1 γ Mn/ml. Für die quantitative kolorimetrische Bestimmung wird die Eichkurve mitgeteilt.

Summary.

The color reaction of manganese with *Arnold*'s reagent (p-p'-tetramethyldiaminodiphenyl-methane) was studied thoroughly. It occurs only at $p_H = 3$ to 4. The disturbing influence of the ferric ion depends not on its percentage excess, but on the absolute concentration of the iron and manganese. The masking of the iron with phosphoric acid or disodiumphosphate is not successful because of the resulting p_H shift. The detection of manganese in iron-bearing solutions is reliable only after the iron has been extracted with ether from the hydrochloric acid solution, which than can be buffered to about $p_H = 3$ by sodium acetate. The detection limit is: 0.001 γ; the limiting concentration: 1 γ Mn/ml. The calibration curve for the quantitative colorimetric determination is given.

Résumé.

On a étudié en détail la réaction colorée du manganèse avec la base d'*Arnold* (p-p'-tétraméthyldiaminodiphénylméthane). Elle ne se produit qu'entre p_H 3 et 4. L'action gênante des ions ferriques ne dépend pas de leur pourcentage en excès mais plutôt de la concentration absolue du fer et du manganèse. Le masquage du fer par l'acide phosphorique ou le phosphate disodique ne conduit pas au but à cause de la modification de p_H qui en résulte. La recherche du manganèse dans des solutions contenant du fer ne peut être effectuée avec sureté qu'après avoir extrait le fer à l'éther à partir d'une solution chlorhydrique tamponnée par l'acétate de sodium à p_H 3 environ. La limite de sensibilité est 0,001 γ; la limite de dilution vaut 1 γ Mn/ml. On donne la courbe d'étalonnage pour le dosage colorimétrique.

Literatur.

[1] *A. Trillat*, C. r. acad. sci., Paris **136**, 1205 (1903).
[2] *J. Tillmans* und *H. Mildner*, J. Gasbel. **57**, 496 (1914).
[3] *R. G. Harry*, J. Soc. Chem. Ind. **50**, 796 (1931).
[4] Badische Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen/Rhein D. R. P. 27032; Farbenfabr. vorm. Friedr. Bayer & Co, D. R. P. 58483.

Istituto di chimica agraria dell'Università di Bologna.

Über die photometrische Mikrobestimmung der Kieselsäure.

Von

C. Ferrari.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 24. Mai 1950.)

Die chemische Literatur über die quantitative Bestimmung kleiner und kleinster Mengen von Kieselsäure ist außerordentlich reichhaltig. Fast alle Methoden haben die Bildung der komplexen Silicomolybdänsäure mit folgender Messung der Extinktion der entstandenen gelben Lösung zur Grundlage. Dieser Vorgang gibt gute Resultate, wenn es sich um kleine Mengen in der Größenordnung von einigen Milligrammen handelt. Sind jedoch noch kleinere Mengen vorhanden (Bruchteile von Milligrammen), wird die Gelbfärbung zu schwach, um zur quantitativen Bestimmung dienen zu können. In diesem Falle gehen die meisten Vorschläge dahin, durch eine teilweise Reduktion einen blau gefärbten Komplex zu erzeugen, welcher neben Kieselsäure Molybdän in fünf- und sechswertiger Form enthält. Die Konstitution dieser Verbindung ist noch unbekannt und wir wollen sie im folgenden als „Silicomolybdänblau" bezeichnen.

Die für diese Bestimmung von den verschiedenen Autoren ausgearbeiteten Vorschriften unterscheiden sich im wesentlichen durch die verwendete Menge des Ammoniummolybdates und der Säure sowie durch die Art des verwendeten Reduktionsmittels.

Es ist bekannt, daß die Phosphorsäure und die Arsensäure analoge Heteropolysäuren bilden, z. B. Phosphormolybdänsäure und Arsenmolybdänsäure. Auch diese Verbindungen geben unter geeigneten Bedingungen (p_H) blaugefärbte Produkte einer teilweisen Reduktion (im folgenden „Phosphormolybdänblau" und „Arsenmolybdänblau" genannt), welche zur photometrischen Bestimmung kleiner Mengen von Phosphorsäure und Arsensäure dienen können[1].

Es besteht aber ein wesentlicher Unterschied im Verhalten der Kieselsäure und der Phosphor- bzw. Arsensäure: Die beiden letzteren befinden

sich unter allen Umständen in echter Lösung, gleichgültig, bei welchem p_H die Bildung der Heteropolysäure vorgenommen wird, während die Kieselsäure dem p_H der Lösung gegenüber sehr empfindlich ist. Es kann daher unter ungünstigen Umständen vorkommen, daß sie sich teilweise oder ganz der Komplexbildung entzieht.

Diese Tatsache sei besonders hervorgehoben. Sie wurde von uns verwendet, um die Phosphorsäure in Gegenwart von Kieselsäure zu bestimmen[2].

Der Einfluß der Acidität auf die Bildung des Silicomolybdänkomplexes, schon von *Němec* und Mitarbeitern[3] beobachtet, ist von *King*[4] sorgfältig bearbeitet worden. Dieser Autor empfiehlt einen Zusatz von 100 mg Ammoniummolybdat nach dem Ansäuern mit 2 ml Schwefelsäure. Die Reduktion erfolgt mit 1,2,4-Amino-Naphthol-Sulfonsäure. Nach 10 Min. wird 1 ml 10-n-Schwefelsäure zugefügt und auf 25 ml aufgefüllt.

Knudson, Juday und *Meloche*[5] haben 1940 neuerdings den Einfluß der Acidität und der Molybdatkonzentration auf die Bildung des Silicomolybdänsäurekomplexes untersucht. Dabei haben diese Autoren eine interessante Feststellung gemacht, nämlich daß das Maximum der Gelbfärbung bei einem p_H von 1,6 bis 2,0 erhalten wird. Sie verwenden 2 ml 10%ige Ammoniummolybdatlösung (bei einem Endvolumen von 100 ml), d. h. 200 mg Ammoniummolybdat unter Zusatz von 1 ml 4-n-Schwefelsäure, welche das p_H in die oben bezeichneten Grenzen bringt.

Wie man sieht, sind die von *Knudson* und Mitarbeitern vorgeschlagenen Schwefelsäuremengen gleich den von *King* angegebenen (wenn man sie auf die gleiche Menge Ammoniummolybdat bezieht). Darin liegt die Erklärung für die guten Resultate, die die letztgenannten Autoren erzielten, obwohl sie das Auftreten der blauen Farbe schon in den Blindproben feststellen mußten, was augenscheinlich auf eine Unvollkommenheit der Methode hinwies. Dies hatte zur Folge, daß zur Vermeidung grober Fehler immer mit einer Testlösung verglichen werden mußte, welche *gleichzeitig* und *unter denselben Umständen* hergestellt worden war.

Die Notwendigkeit der Einhaltung einer bestimmten Acidität zum Zwecke der Bildung des gelben Molybdänsäurekomplexes ist neuerlich bestätigt worden bei den Untersuchungen von organischen Abkömmlingen der Kieselsäure von *Iler* und *Pinkney*[6] und von *Ferrari*[7] in einer neueren Arbeit über die Aufnahme der Kieselsäure durch Pflanzenwurzeln.

Zur Lösung der Aufgabe, kleinste Mengen von Kieselsäure quantitativ zu bestimmen, erschien es notwendig, bei Verwendung der Molybdänblaureaktion die genauen Bedingungen festzustellen, unter welchen alle Unzukömmlichkeiten vermieden werden, die von *King* und anderen aufgezeigt wurden[8].

Die Bildung der blauen Farbe in den Blindproben erklärt sich dadurch, daß außer dem Silico-, Arsen- und Phosphormolybdänblau auch aus

Molybdänpentoxyd und Molybdänsäure ein blau gefärbter Komplex gebildet wird, den wir zur Unterscheidung von dem früher erwähnten als „reines Molybdänblau" bezeichnen wollen.

In einer früheren Mitteilung[2] haben wir die unterschiedlichen Merkmale der verschiedenen Arten von Molybdänblau beschrieben, ihre Bildungs- und Existenzbedingungen festgestellt. Wir haben dabei hervorgehoben, daß keine andere Tatsache so gut das „reine Molybdänblau" von den anderen blau gefärbten Molybdänkomplexen zu unterscheiden gestattet, als der Aciditätsgrad, bei welchem es sich bilden kann und beständig ist.

In einer schwach sauren Ammoniummolybdatlösung wird durch Reduktionsmittel eine Blaufärbung hervorgerufen, in stark sauren Lösungen bildet sich dagegen eine gelbe Färbung. Dieses unterschiedliche Verhalten wird so ausgelegt, daß man Salzbildung des durch die Reduktion gebildeten fünfwertigen Molybdäns mit dem nicht reduzierten sechswertigen Molybdän annimmt, während bei Gegenwart großer Säuremengen eben diese Säure die Salzbildung mit dem fünfwertigen Molybdän übernimmt.

Säuert man eine Molybdatlösung genügend an, um die Blaufärbung durch ein Reduktionsmittel zu verhindern, und setzt hierauf eine geringe Menge von Phosphat, Arseniat oder Silikat zu, so erscheint sofort die Blaufärbung; diese ist jedoch nicht dem Mo^{V}-Salz der Molybdänsäure zuzuschreiben, sondern den Reduktionsprodukten der betreffenden komplexen Säuren, welche niedrigem p_H gegenüber beständiger sind als das erwähnte Salz.

Ich habe bei dieser Gelegenheit festgestellt, daß die Grenzacidität, bei welcher das „reine Molybdänblau" noch existenzfähig ist, von der Molybdänsäurekonzentration in der betreffenden Lösung abhängt: Für 72, 144, 216 mg Ammoniummolybdat in 100 ml Lösung sind 25, 50, 75 ml Normalschwefelsäure nötig, um die Bildung des reinen Molybdänblaus zu verhindern. Unterhalb dieser Acidität ist das reine Molybdänblau beständig und seine Bildung und seine Farbintensität sind sehr empfindlich gegen die geringsten Schwankungen der Acidität.

Oberhalb der Aciditätsgrenze des reinen Molybdänblaus liegt das Gebiet des Phosphor-, Arsen- und Silicomolybdänblaus, welche bei einem Gehalt von 25 bis 50 ml Normalschwefelsäure auf 72 mg Molybdat in 100 ml beständig sind. Ihr Existenzbereich ist also sehr weit und daher leicht für analytische Zwecke auszunützen: man muß nur darauf achten, daß die obere Grenze nicht überschritten wird, was eine Verminderung der Färbung zur Folge hätte.

Hält man sich diese Bemerkungen über die verschiedenen Arten von Molybdänblau vor Augen, so erscheint es klar, warum die Bestimmung kleiner Kieselsäuremengen nach *King* zu unsicheren Resultaten führen

muß. Da dieser Autor in sehr schwach sauren Lösungen arbeitet, erzielt er nicht nur die Bildung des gelben Silicomolybdänkomplexes, sondern er bleibt außerdem im Existenzbereich des reinen Molybdänblaus und daher können auf diese Weise nur bei streng eingehaltener Acidität und unter Verwendung von unter gleichen Bedingungen erhaltenen Vergleichslösungen einigermaßen brauchbare Resultate erzielt werden.

Daher ist die Reduktion unter allen Umständen außerhalb des Existenzbereiches des reinen Molybdänblaus durchzuführen, d. h. bei genügend großer Acidität. Setzt man jedoch gleich von Anfang an zu der mit Molybdat versetzten Silikatlösung die oben zur Verhinderung der Bildung des reinen Molybdänblaus definierte Säuremenge zu, so erhält man nach Zusatz des Reduktionsmittels schwächere Färbungen, als man unter sonst gleichen Bedingungen, jedoch bei der für die Bildung des gelben Silicomolybdänsäurekomplexes günstigsten Acidität erhält.

Dies steht in bestem Einklang mit dem über den Einfluß des p_H auf die Bildung des Silicomolybdänsäurekomplexes Gesagten. Man erhält nur dann das Maximum der Gelbfärbung, wenn das p_H der Lösung in den Bereich 1,6 bis 2,0 gebracht wird. Es muß besonders betont werden, daß diese Herabsetzung des p_H so rasch als möglich erfolgen muß, worauf schon *Iler* und *Pinkney* (l. c.) hingewiesen haben.

In der Ausführungsvorschrift werden wir Angaben machen, wie einerseits die Bildung des reinen Molybdänblaus zu verhindern, anderseits aber die volle Entwicklung des Siliziummolybdän-Säurekomplexes zu sichern ist.

Ein weiterer Umstand von größter Bedeutung ist die Art des Reduktionsmittels: In einer Veröffentlichung über die Bestimmung der Phosphorsäure[1] haben wir uns mit diesem Problem auseinandergesetzt und die Gründe aufgezeigt, welche zur Wahl des Hydrazins geführt haben. Dem scheinbaren Nachteil, nur in der Wärme zu reagieren, stehen viele Vorteile in Bezug auf andere organische Reduktionsmittel gegenüber, wenn man nicht Phosphorsäure in Gegenwart veresterter Anteile bestimmen muß. Es seien drei Vorteile angeführt, die auch im Falle der teilweisen Reduktion des Silicomolybdänsäurekomplexes gelten und für die Verwendung des Hydrazinsulfats sprechen. Der erste ist die überaus große Stabilität der erhaltenen Blaufärbungen, welche anstatt einiger Minuten durch einige Tage hindurch konstant bleiben. Der zweite Vorteil ist die Farblosigkeit der Oxydationsprodukte des Reduktionsmittels. Der dritte Vorteil ist die Möglichkeit der Kieselsäurebestimmung auch in Gegenwart von Eisen.

Es ist bekannt, daß die Verbindungen des fünfwertigen Molybdäns durch Fe(III) oxydiert werden. *King* schreibt daher vor, das Eisen vor der Kieselsäurebestimmung quantitativ zu entfernen; aber diese Abtrennung des Eisens ist sehr zeitraubend und nicht ohne Folgen. Da das

Hydrazinsulfat, welches auch das dreiwertige Eisen reduziert, ohne Bedenken im Überschuß angewendet werden kann, da keine sekundären Färbungen zu befürchten sind, ist die Bestimmung auch in Gegenwart von Eisen ausführbar, indem man das Reduktionsmittel in solcher Menge hinzufügt, daß zunächst die Blaufärbung erscheint (was nach der vollständigen Reduktion des Eisens der Fall ist), und dann noch einen Überschuß von Hydrazinsulfat zusetzt.

Wie schon erwähnt, wurde die Abhängigkeit der Bildung der betreffenden Komplexe von der Acidität von uns benützt[2], um die Phosphorsäure in Gegenwart von Kieselsäure mittels der Molybdänblaureaktion zu bestimmen: man muß zu diesem Zwecke die Säuremenge, die zur Verhinderung der Bildung des reinen Molybdänblaus nötig ist, *vor dem Zusatz* des Ammoniummolybdats zufügen, um die Bildung des gelben Silicomolybdänkomplexes *augenblicklich und vollständig* zu verhindern, während die Bildung des Phosphormolybdänsäurekomplexes dadurch in keiner Weise gestört wird. Ein Zusatz von überschüssigem Reduktionsmittel erzeugt Blaufärbungen, deren Intensität der Phosphorsäuremenge streng proportional ist, ohne irgendwie von Kieselsäure beeinflußt zu sein. Die Mindestsäuremenge zur Verhinderung der Bildung des Silicomolybdänblaus (Säurezusatz *vor* Molybdatzusatz) ist von der Silicatkonzentration abhängig: für Mengen von 2, 5, 10 mg sind bei Gegenwart von 72 mg Molybdat und einem Volumen von 100 ml jeweils 28, 32, 34 ml Normalschwefelsäure notwendig.

Dieses eigenartige Verhalten der Kieselsäure erlaubt also ihre Bestimmung auch in Gegenwart von kleinen Phosphorsäuremengen deren Abscheidung wie die des Eisens mühsam und nicht ohne Unzukömmlichkeiten ist.

Zu diesem Zwecke ist eine zweifache Bestimmung im selben Lösungsvolumen auszuführen: In einer Probe wird sowohl das Silicomolybdänblau als auch das Phosphormolybdänblau gebildet, was durch Ansäuern in zwei Phasen wie bei der Bestimmung der Kieselsäure allein zu geschehen hat. — In einer zweiten Probe wird auf einmal, und zwar *vor* dem Molybdatzusatz, angesäuert, wodurch die Bildung der Silicomolybdänsäure und damit auch ihrer Reduktionsprodukte verhindert wird. Die Extinktion des Silicomolybdänblaus wird aus der Differenz erhalten, da die Absorptionskurven der beiden Arten von Molybdänblau gleichen Gang aufweisen.

Es ist bei der gleichzeitigen Bestimmung von Kieselsäure nur darauf zu achten, daß die zur Bildung der beiden Komplexe notwendige Molybdatmenge vorhanden ist und jene Säuremenge verwendet wird, welche die Bildung des reinen Molybdänblaus verhindert.

Die Bestimmung der Kieselsäure in Gegenwart von Ferrisalzen und Phosphorsäure unter Verwendung von Hydrazinsulfat als Reduktionsmittel ist Gegenstand einer künftigen Veröffentlichung.

Ausführungsvorschrift für die photometrische Bestimmung der Kieselsäure (als Silicomolybdänblau).

Reagenzien:

Lösung A: Wässerige Lösung von 14,4 g Ammoniummolybdat im Liter; 5 ml enthalten 72 mg Ammoniummolybdat bzw. 60 mg Molybdänsäure im Liter.

Lösung B: Lösung von 240 ml konzentrierter Schwefelsäure, d = 1,84, im Liter; 5 ml entsprechen 40 bis 45 ml n-Schwefelsäure.

Lösung C: 1%ige Lösung von Hydrazinsulfat.

Lösung D: 2%ige Natriumbikarbonatlösung.

Bei Verwendung des *Pulfrich*-Photometers wird das Filter S 61 vorgeschlagen, für welches bereits der Analysenfaktor des Phosphormolybdänblaus bestimmt wurde: er beträgt 7,553, wenn die Phosphorpentoxydkonzentration in γ/ml ausgedrückt wird. Wie schon erwähnt, ist die Absorptionskurve des Silicomolybdänblaus analog.

Für die Bestimmung kleiner Kieselsäuremengen können dieselben Reagenzien verwendet werden. Die Notwendigkeit der Einhaltung einer bestimmten Acidität für die Bildung des Silicomolybdänsäurekomplexes und die daraus folgende Reihenfolge des Zusatzes der Reagenzien erfordert die getrennte Anwendung von Lösung A und B.

Zur Konstruktion der Extinktionskurve wurde eine Lösung von Natriumsilicat verwendet, welche 0,1 mg SiO_2 im ml enthielt und durch Verdünnung einer konzentrierteren analysierten Lösung hergestellt wurde.

Die Farbreaktion muß unter Verwendung von variablen Mengen dieser Lösung (entsprechend 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 mg SiO_2) in folgender Weise ausgeführt werden:

In einem 250-ml-Kolben wird die verwendete Menge der Testlösung mit Wasser auf ungefähr 50 ml gebracht und 5 ml der Lösung A zugesetzt. Zu dieser leicht alkalischen Lösung werden 0,3 bis 0,4 ml der Lösung B hinzugefügt. Dadurch wird das p_H der Lösung auf 1,5 bis 2,0 herabgesetzt. *Man läßt durch 10 Min. stehen und setzt hierauf 1 ml der Lösung C und sofort 4,6 bis 4,7 ml der Lösung B zu. Man erwärmt sodann auf einem siedenden Wasserbad.* Nach 30 Min. kühlt man ab und bringt das Volumen auf 100 ml. Die Lösung ist nun zur photometrischen Messung bereit, die Färbung bleibt durch sehr lange Zeit konstant.

In Tabelle 1 sind die Resultate einer solchen Bestimmungsreihe mit Siliziumkonzentrationen von 0,5 bis 5 γ/ml zusammengestellt.

Unter diesen Umständen wird nur die lösliche Kieselsäure bestimmt, nicht die vorhandene Gesamtkieselsäure. Man erhält tatsächlich stärkere Färbungen, wenn man vor dem Zusatz des Molybdats und der ersten Säuremenge in der Wärme mit einer geeigneten Menge Bikarbonat be-

handelt und dann in der oben beschriebenen Weise fortfährt. Es muß in diesem Falle nur die Säuremenge erhöht werden, da ja das zugesetzte Bikarbonat neutralisiert und das p_H 1,5 bis 2,0 eingestellt werden muß.

Tabelle 1.

γ SiO_2 pro ml	Schichtdicke	Durchlässigkeit	Extinktion	Spezifische Extinktion
c	s	D %	E	$k = \frac{E}{s}$
0,5	5	47,00	0,328	0,0656
1	5	23,25	0,634	0,1268
2	3	20,00	0,699	0,2330
3	2	19,20	0,717	0,3585
4	2	12,00	0,921	0,4605
5	1	27,50	0,560	0,5600

Diese Vorbehandlung mit Bikarbonat ermöglicht die Bestimmung der Gesamtkieselsäure, da hierdurch der kolloidale Anteil der Kieselsäure in die lösliche Form übergeführt wird[9]. Als geeignete Menge wird 0,2 g *Natriumbikarbonat* vorgeschlagen; diese Menge wird von 2,4 ml n-Schwefelsäure neutralisiert, entsprechend 0,3 ml des Reagens B. Die Löslichmachung der Kieselsäure erfolgt in Platingefäßen, um Fehler durch Kieselsäure des Glases zu vermeiden. Die abgekühlte Lösung wird mit 5 ml Molybdatlösung A versetzt, mit 0,6 ml Lösung B angesäuert und nach 10 Min. mit dem Reduktionsmittel versetzt. Hierauf wird sofort die restliche Säuremenge (4,7 ml) zugesetzt, auf dem siedenden Wasserbad durch 30 Min. erwärmt und auf 100 ml aufgefüllt.

Tabelle 2 enthält die Resultate von Bestimmungen, bei denen gleiche Volumina Kieselsäurelösung wie in der Tabelle 1, jedoch nach vorausgehender Löslichmachung verwendet wurden.

Tabelle 2.

γ SiO_2 pro ml	Schichtdicke	Durchlässigkeit	Extinktion	Spezifische Extinktion	Analysenfaktor
c	s	D %	E	$k = \frac{E}{s}$	$A = \frac{c}{k}$
0,5	5	47,00	0,328	0,0656	7,622
1	5	22,75	0,643	0,1286	7,776
2	3	17,8	0,750	0,2500	8,000
3	2	17,75	0,751	0,3755	7,990
4	2	10,25	0,989	0,4945	8,089
5	1	24,5	0,611	0,6110	8,183
				Im Durchschnitt	7,943

Aus den Ergebnissen der Tabellen 1 und 2 wurden die Kurven (I und II) der Abb. 1 erhalten. Man sieht, daß in beiden Fällen das *Beer*sche Gesetz zumindest für Konzentrationen bis 5 γ Kieselsäure/ml gültig ist.

Aus Angaben der Tabelle 2 kann man den Analysenfaktor (A) berechnen; wenn man die Konzentration der Kieselsäure in γ/ml ausdrückt, ist dieser 7,943.

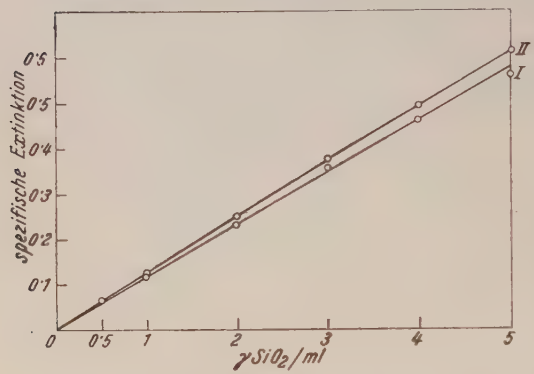


Abb. 1.

Zusammenfassung.

Auf Grund einer Untersuchung der verschiedenen Arten von Molybdänblau und der Bestimmung ihrer Existenzbereiche wird ein neues Verfahren zur Bestimmung der Kieselsäure mit Hilfe der Molybdänblaureaktion beschrieben. Dieses Verfahren ist gleicherweise zur Bestimmung der löslichen wie der Gesamtkieselsäure geeignet. Es vermeidet vollständig das Auftreten von Blaufärbungen in den Blindproben und gestattet daher die Ausführung von Absolutmessungen. Die gleichzeitige Herstellung von Vergleichslösungen ist nicht mehr nötig.

Die große Stabilität der Färbungen, die mit einem geeigneten Überschuß des Reduktionsmittels erhalten werden, läßt dieses Verfahren besonders zur Ausführung von Reihenanalysen geeignet erscheinen.

Summary.

A new procedure for the determination of silica with the aid of the molybdenum blue reaction is described on the basis of a study of the various kinds of molybdenum blue and the determination of its range of existence. This method is similarly suited for the determination of the soluble as well as the total silica content. It completely avoids the appearance of blue colorations in the blanks, and therefore permits the making of absolute determinations. It is no longer necessary to prepare comparison solutions at the same time. The great stability of the colorations, which are obtained with an appropriate excess of the reducing agent, makes it appear that this prodecure will be especially suited for series analyses.

Résumé.

On décrit un nouveau dosage de la silice au moyen de la réaction au bleu de molybdène, sur la base d'une investigation des différentes sortes de bleu de molybdène et de la détermination de leur domaine d'existence. Ce procédé convient aussi bien pour le dosage de la silice libre ou globale. Il évite complètement l'introduction de colorations bleues dans les essais témoins et permet

par conséquent d'aborder des mesures absolues. L'emploi simultané de solutions étalons n'est plus nécessaire. La grande stabilité des teintes qui sont obtenues par un excès convenable d'agent réducteur, rend ce procédé convenable pour la mise en oeuvre des analyses en série.

Literatur.

[1] *C. Ferrari*, Ricerche di microanalisi fotometrica IV. Dosamento colorimetrico dell'acido fosforico. Memorie Accademia Scienze Istituto Bologna, Serie IX, Tomo III (1935/36). — *C. Ferrari*, Analisi microchimiche colorimetriche, Ed. Cesare Zuffi, Bologna, 1947.

[2] *C. Ferrari*, I bleu di molibdeno e il dosamento colorimetrico dell'acido fosforico in presenza di acido silicico. Memorie Accademia Scienze Istituto Bologna, Serie IX, Tomo IV (1936/37).

[3] *A. Němec, J. Lanik* und *E. Koppová*, Z. analyt. Chem. **83**, 428 (1931).

[4] *E. J. King* und *H. Stantial*, Biochemic. J. **27**, 990 (1933). — *E. J. King*, Biochemic. J. **33**, 944 (1939).

[5] *H. W. Knudson, C. Juday* und *V. W. Meloche*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **12**, 270 (1940); aus Z. analyt. Chem. **125**, 194 (1943).

[6] *R. K. Iler* und *P. S. Pinkney*, Ind. Engng. Chem. **39**, 1379 (1947).

[7] *C. Ferrari*, Sull'assorbimento radicale dell'acido silicico. Nota preliminare. Bolletino Scientifico Facoltà Chimica Industriale Bologna (1949).

[8] *R. Strohecker, R. Vaubel* und *K. Breitwieser*, Z. analyt. Chem. **103**, 8 (1935).

[9] *F. D. Snell* und *C. T. Snell*, Colorimetric methods of analysis, Vol. I, Chapman und Hall, London, 1936, p. 518.

[10] *V. Gazzi*, Spettroscopia applicata all'analisi chimica, Ed. Cesare Zuffi, Bologna, 1944.

Istituto di chimica analitica dell'Università, Firenze.

Die Oxydation des Germaniums (2) an der Quecksilbertropfelektrode und ihre analytische Anwendung.

Von

D. Cozzi und **S. Vivarelli.**

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 30. Mai 1950.)

Die Literatur über polarographische Untersuchungen des Germaniums ist sehr spärlich. Die ersten Untersuchungen gehen auf *Th. Österud* und *M. Prytz*[1] zurück, die Germaniumtetrachloridlösungen in verdünnter Perchlorsäure untersuchten. Die Autoren fanden zwei Kathodenstufen, welche sie durch die stufenweise Reduktion des vierwertigen Germaniums zu metallischem Germanium erklären.

I. P. Alimarin und *B. N. Ivanov-Emin*[2] erklären hingegen, daß weder im alkalischen noch im sauren Milieu, noch in Lösungen, die komplexbildende Ionen enthalten (Flußsäure, Oxalsäure), Reduktionsstufen erhalten werden, wenn man von Lösungen des vierwertigen Germaniums ausgeht. Sie konnten dagegen beobachten, daß man eine wohldefinierte und für analytische Zwecke gut brauchbare Reduktionsstufe erhält, wenn man Lösungen des zweiwertigen Germaniums in 6 n-Salzsäure untersucht. Das Halbwellenpotential ist unter diesen Umständen und bei einer Germaniumkonzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ Mol $-0{,}45$ bis $-0{,}5$ V. Dieser Wert wird negativer bei Herabsetzung der Germaniumkonzentration und positiver bei Verminderung der Salzsäurekonzentration. Die quantitative Bestimmung ist nach diesen Autoren noch bei der Größenordnung von 10^{-6} Mol möglich, wird aber durch die Gegenwart von Arsen, Blei und Zinn verhindert. In dieser Arbeit findet sich kein Hinweis auf den Oxydationsprozeß des zweiwertigen Germaniums, sie beschränkt sich auf die Untersuchung der Reduktion des zweiwertigen Germaniums und nur in sehr stark sauren Lösungen und so ist es erklärlich, daß den Autoren die Beobachtung jenes Vorganges, der bei Salzsäurekonzentrationen unterhalb 2 n verläuft, entgangen sein muß.

Dies bedeutet aber nicht, daß die Oxydation des zweiwertigen Germaniums an der Tropfelektrode nur bei kleinen Salzsäurekonzentrationen möglich ist. In Wirklichkeit übt die Acidität der Lösung keinen nennenswerten Einfluß auf die Reaktion aus und das Halbwellenpotential verändert sich nur wenig bei Variation der Säurekonzentration von 6 n bis 0,4 n. Der negative Effekt wird durch die Chlorionen hervorgerufen, welche die Elektrode um so mehr depolarisieren, je höher ihre Konzentration ist und so den Potentialbereich beschränken, weshalb die anodische Stufe des Germaniums nicht auftritt (Abb. 1).

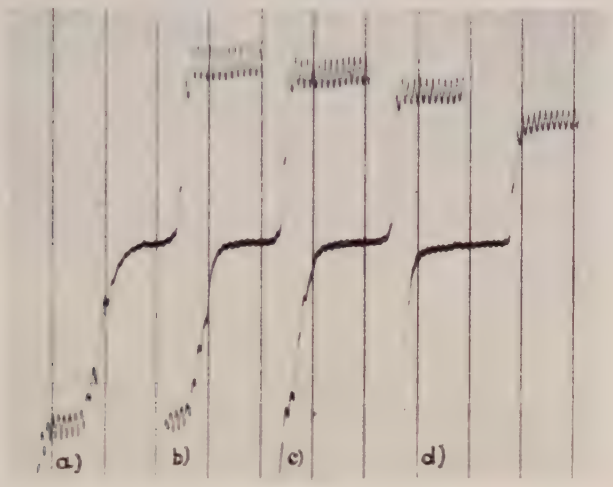


Abb. 1.

a) Konz. $Ge^{++} = 3{,}3 \cdot 10^{-4}$ m
.. HCl $5{,}1 \cdot 10^{-1}$ m
b) „ $Ge^{++} = 3{,}1 \cdot 10^{-4}$ m
.. HCl = 1,0 m
c) Konz. $Ge^{++} = 2{,}8 \cdot 10^{-4}$ m
.. HCl = 2,0 m
d) „ $Ge^{++} = 3{,}1 \cdot 10^{-4}$ m
„ HCl = 6,0 m

Diese Stufe kann also nur festgestellt werden, wenn die Säurekonzentration nicht über 2 n liegt. Wenn man Sorge trägt, die Chlorionenkonzentration niedriger zu halten, indem man die Eigenschaft des Cadmiumions, komplexe $CdCl_4''$-Ionen zu bilden, ausnützt oder den größten Teil der Säure durch andere Säuren, wie Schwefelsäure oder Perchlorsäure, ersetzt (die gesamte Salzsäure kann nicht ersetzt werden, da die Reduktion des Germaniums in 5 n Salzsäure vorgenommen werden muß), ist die Anodenstufe des Germaniums ausgezeichnet meßbar, und zwar auch bei Gegenwart von viel Säure (Abb. 2).

Vom analytischen Standpunkt ist diese Tatsache ausgezeichnet für mikrochemische Bestimmungen auswertbar und die anodische Stufe, die der Konzentration proportional ist, kann schon bei Konzentrationen von 1.10^{-6} Mol/l ausgewertet werden.

Ausgehend vom vierwertigen Germanium ist der Vorgang folgender: Die Lösung wird mit Salzsäure bis zur Konzentration 5 n angesäuert. Von dieser Lösung werden 1,25 ml in einen Meßkolben von 15 ml (*A* in Abb. 3) gebracht. In diesem Kölbchen befinden sich, durch *a* eingeführt, bereits 0,1 g Natriumhypophosphit. Man schließt *a* und leitet durch *b* Wasserstoff ein, bis die Luft im Kölbchen *A* und im Kühler verdrängt ist. Hierauf bringt man den Inhalt des Kölbchens für fünf Minuten zum Sieden, läßt auskühlen und fügt durch den Hahn *c* soviel Grundlösung hinzu, daß die Marke erreicht wird und mischt gut durch, indem man einen schwachen Wasserstoffstrom durchleitet. Die Grundlösung wird im vollständig entlüfteten Gefäß *D* unter Wasserstoff aufbewahrt. Schließt man nun die Hähne *b* und *f* und

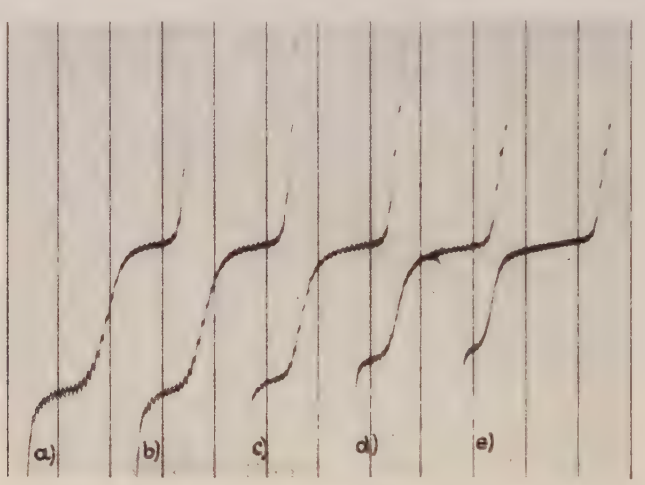


Abb. 2. Die Lösungen sind molar an $CdSO_4$, 0,5 n an HCl.

a) ist auch $3{,}0 \cdot 10^{-4}$ m Ge^{++}; 0 H_2SO_4
b) $2{,}9 \cdot 10^{-4}$ m „ ; 0,5 n „
c) $2{,}6 \cdot 10^{-4}$ m Ge^{++}; 1,5 n H_2SO_4
d) $2{,}2 \cdot 10^{-4}$ m „ ; 3,0 n „
e) $2{,}1 \cdot 10^{-4}$ m „ ; 5,5 n „

öffnet *g* und *h*, so kann man die Lösung in die Elektrolysenzelle überführen, indem man durch *g* Wasserstoff einläßt. Die Elektrolysenzelle *B* ist durch einen Heber mit einer gesättigten Kaliumchlorid-Kalomelelektrode verbunden; auch sie ist von *i* aus mit Wasserstoff versorgt.

Die vorhin erwähnten Grundlösungen waren folgender Zusammensetzung:

1. 1,1 m Cadmiumsulfat; 1,15 n Salzsäure;
2. 1,1 m Cadmiumsulfat; 4,0 n Schwefelsäure;
3. 1,1 m Cadmiumsulfat; 6,2 n Schwefelsäure;
4. 6,2 n Ammoniumsulfat; 0,7 n Natriumacetat.

Die für die polarographische Bestimmung des Germaniums am besten geeignete Lösung ist 1; in ihr ist die Anodenstufe klar ausgebildet und der Diffusionsstrom ist konstant, so daß die Auswertung in der besten Art erfolgen kann.

In dieser Lösung ist bei 25° C die Konstante des Diffusionsstromes $k = 2{,}01$, gefunden als Mittelwert zahlreicher Messungen mit einem

Fehler von $\pm 2\%$. Das Halbwellenpotential liegt bei $-0{,}130$ V. Auch für kleine Konzentrationen des Germaniums ist die Stufe ausgezeichnet meßbar, besonders wenn man für das Galvanometer eine Gegenstromeinrichtung zur Kompensation des durch die Ladung des Kondensators Tropfen-Lösung hervorgerufenen Grundstromes verwendet.

Die Verwendung der Grundlösung 1 gestattet die Bestimmung des Germaniums in allen Fällen, wenn nur Kupfer, Wismut und Antimon

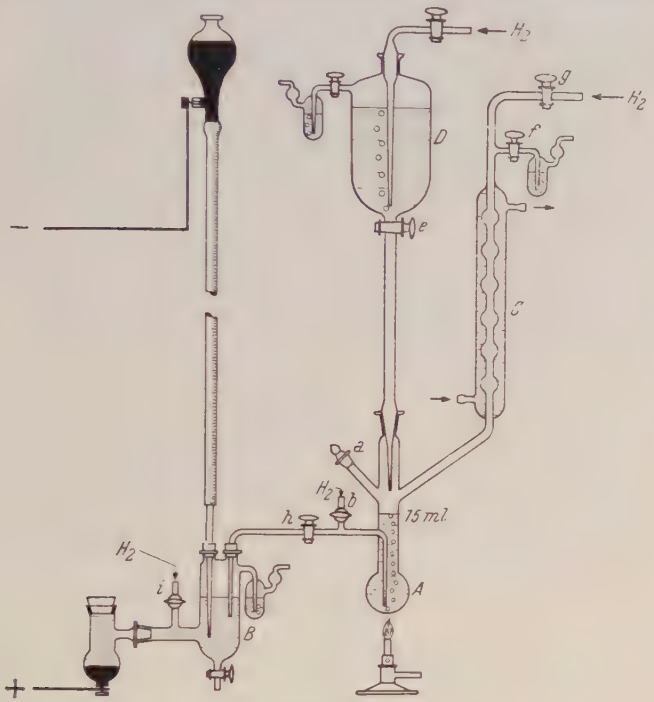


Abb. 3.

abwesend sind. In Gegenwart des Wismuts stellt sich folgendes Gleichgewicht ein: $2\,Bi^{+++} + 3\,Ge^{++} \rightleftarrows 3\,Ge^{++++} + 2\,Bi$. Es führt zur Ausfällung von metallischem Wismut und zur Oxydation des Germaniums. Die Resultate sind daher, auch wenn die Anodenstufe richtig ausgebildet ist, immer zu niedrig.

In Gegenwart von einwertigem Kupfer und von dreiwertigem Antimon addieren sich die Reduktionsstufen dieser Elemente mit der Anodenstufe des Germaniums (das Kupfer ist einwertig infolge der Reduktion durch das Hypophosphit). In Gegenwart dieser Metalle erhält man Polarogramme nach 4 b, in welchen der Germaniumanteil deutlich sichtbar ist (jener Teil der Stufe, der unter der Nullinie des Galvanometers

liegt) neben dem Anteil, der diesen Elementen zuzuschreiben ist (jener Teil der Welle, der oberhalb der Nullinie liegt).

Die quantitative Bestimmung der Konzentration des Germaniums kann in Gegenwart von Kupfer und Antimon ohne nennenswerten Fehler durchgeführt werden, wenn man von der Intensität des Anodenstromes die Intensität des Reststromes abzieht (s. Abb. 4a), welcher ein für allemal mit kupfer- und antimonfreien Germaniumlösungen bestimmt wird, indem man als Bezugslinie die Nullstellung des Galvanometers nimmt.

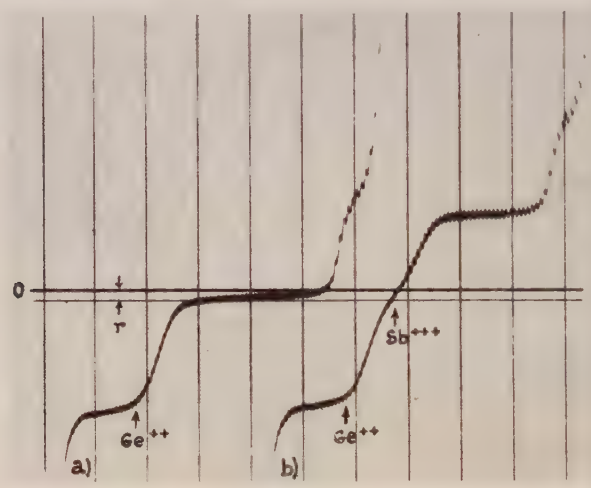


Abb. 4.
a) Grundlösung 1, $3{,}2 \cdot 10^{-4}$ m Ge^{++}
b) id. $3{,}0 \cdot 10^{-4}$ m Ge^{++}; $2{,}9 \cdot 10^{-4}$ m Sb^{+++}

Dieses Verfahren, das also nur durch die Gegenwart des Wismuts gestört wird, kann mit allen vier angegebenen Grundlösungen ausgeführt werden. Mit den Grundlösungen 2 und 3, welche durch eine höhere Säurekonzentration ausgezeichnet sind und dadurch die Reduktion des Wismuts nicht zulassen, ist die Anodenstufe des Germaniums zumindest bei kleinen Wismutkonzentrationen ausgezeichnet meßbar.

Kennt man die der Anodenstufe zugehörige Stromstärke, so kann man die Germaniumkonzentration entweder durch eine der üblichen Methoden oder mit Hilfe der Gleichung von *D. Ilkovic*[3] bestimmen, sobald man die Konstante des Diffusionsstromes kennt:

$$C_{Ge++} = \frac{\mu A}{k m^{2/3} t^{1/6}}$$

In dieser Gleichung ist C die Germaniumkonzentration in Millimol, k ist die Konstante für die betreffende Grundlösung, m die Menge des durch die Kapillare in einer Sekunde fließenden Quecksilbers, t das

Tropfenintervall in Sekunden bei in die Versuchslösung eingetauchter Kapillare im Potentialbereich der in Frage stehenden Stufe. Die Grundlösung 2 hat Eigenschaften, die jenen der Lösung 1 sehr ähnlich sind. Die Ablesung der Germaniumstufe ist aber durch den Grundstrom erschwert, wenn die Konzentration unter 6.10^{-5} Mol l sinkt. Eventuell anwesendes Wismut wird nicht zu Metall reduziert, gibt aber eine kathodische Stufe, die sich der anodischen des Germaniums addiert. Das Kupfer stört wie bei der Lösung 1, das Antimon wird bei deutlich negativerem Potential reduziert, doch ist die Potentialdifferenz nicht genügend groß, um eine gute Trennung zu ermöglichen. Die Konstante des Diffusionsstromes ist bei 25° C gleich 1.83 ($\pm$ 0,03). Das Halbwellenpotential ist — 0,09 bis — 0,1 V.

Die Grundlösung 3 liefert ähnliche Resultate wie die Lösung 2, soweit sich dies auf das Kupfer und Wismut bezieht, sie gestattet aber die Trennung von Antimon. Die Konstante des Diffusionsstromes bei 25° C ist 1.68 ($\pm$ 0,02), das Halbwellenpotential ist — 0,06 bis 0,07 V.

Die Grundlösung 4 verhält sich ähnlich der Lösung 1 in bezug auf das Wismut und das Antimon, gestattet aber die Trennung vom Kupfer. Die Konstante des Diffusionsstromes ist bei 25° C gleich 0,76 ($\pm$ 0,01), das Halbwellenpotential liegt bei — 0,420 V. Alle anderen gewöhnlichen Metalle stören nicht, weil die betreffenden Halbwellenpotentiale deutlich von dem des Germaniums verschieden sind oder aber weil sie während des Erwärmens mit Hypophosphit zu Wertigkeitsstufen reduziert werden, die nicht stören (Eisen) oder zu Metall reduziert werden (Arsen).

Über die Beziehungen zwischen Acidität und Halbwellenpotential sowie zwischen Diffusionsstrom und Zusammensetzung der Lösung wird in einer folgenden Arbeit berichtet werden.

Zusammenfassung.

Das durch Reduktion von vierwertigem Germanium mit Natriumhypophosphit erhaltene zweiwertige Germanium gibt in saurer Lösung eine Anodenstufe, die der Konzentration vollkommen proportional ist. Die Messung der Stufenhöhe wird durch einen Überschuß von Chlorionen gestört. Um dieser Tatsache zu begegnen, werden cadmiumhaltige Grundlösungen vorgeschlagen. Die quantitative Bestimmung kann bereits bei Konzentrationen von 1.10^{-6} Mol l vorgenommen werden, ohne daß bei Einhaltung bestimmter Bedingungen die gewöhnlich vorkommenden Metalle stören.

Summary.

The bivalent germanium obtained by reduction of quadrivalent germanium by means of sodium hypophosphite, gives, in acid solution, an anode stage, which is completely proportional to the concentration. The measurement

of the height of the stage is interfered by an excess of chloride ions. To overcome this difficulty, it is advised that cadmium-bearing solutions be used. The quantitative determination can be made even at concentrations of 1×10^{-6} mol/liter with no interference by the metals usually present, provided certain conditions are mainteined.

Résumé.

Le germanium bivalent obtenu par réduction du germaniun tétravalent avec l'hypophosphite de sodium donne, en solution acide, une vague anodique qui est rigoureusement proportionelle à la concentration. La mesure de la hauteur du palier est troublée par un excès d'ions chlore. Pour prévenir ce fait, on préconise l'emploi de solutions de base contenant du cadmium. La mesure quantitative peut déjà être effectuée pour des concentrations de $1 \cdot 10^{-6}$ Mol/l sans que les métaux habituellement rencontrés ne gênent, à condition d'observer des conditions précises.

Literatur.

[1] *Th. Österud* und *M. Prytz*, Arch. Math. Naturvidensk. **47**, 73 (1943) durch Chem. Abstr. **39**, 2022 (1945).

[2] *I. P. Alimarin* und *B. N. Ivanov-Emin*, J. Applied Chem. USSR. **17**, 204 (1944) durch Chem. Abstr. **39**, 2933 (1945).

[3] *D. Ilkovic*, Collection Czechoslov. Chem. Commun. **6**, 498 (1934).

Istituti di Merceologia delle Università di Bari e Bologna.

Über die Grenzen des Anwendungsbereiches der Extrapolationsmethode bei photometrischen und fluorometrischen Analysen.

Von

Walter Cinsa und Giorgio Nebbia.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 31. Mai 1950.)

Unter dem Ausdruck „Extrapolationsmethode" versteht man jenen analytischen Vorgang, bei welchem abgestufte Mengen der zu bestimmenden Substanz einem Substrat zugesetzt werden und der unbekannte Gehalt dieses Substrates an zu bestimmender Substanz durch Extrapolation jener Geraden bestimmt wird, welche in der graphischen Darstellung die Konzentration als Funktion eines analytischen Parameters darstellt (Absorption bei photometrischen Messungen, Gewicht oder Volumen bei gravimetrischen bzw. volumetrischen Analysen, Fluorometerablesungen bei Fluoreszenzbestimmungen usw.).

Die Extrapolationsmethode erlaubt Bestimmungen auch in Gegenwart von Stoffen, die mit der Hauptreaktion interferieren; in diesem Falle wäre die Verwendung einer Eichkurve, die mit einer reinen Substanz gewonnen wurde, unverwendbar. Im allgemeinen muß nach dieser Methode auf die besonderen Bedingungen und Umstände, unter denen die Reaktion durchgeführt wird, Rücksicht genommen werden.

Die Methode ist besonders bei mikroanalytischen Bestimmungen von großem Nutzen und wurde auch in einigen neueren Arbeiten verwendet[1]. Die lange Erfahrung, die wir auf diesem Gebiet haben, hat uns einige Beschränkungen aufgezeigt, denen diese Methode unterworfen ist. In der vorliegenden Arbeit erläutern wir diese Beschränkungen an Hand von zwei Beispielen, und zwar an der photometrischen Bestimmung der Nicotinsäure und der fluorometrischen Bestimmung des Aneurins in Substrat mit bekanntem Gehalt.

Aus den erhaltenen Resultaten, die in Abb. 1 und 2 zusammengefaßt sind, geht hervor:

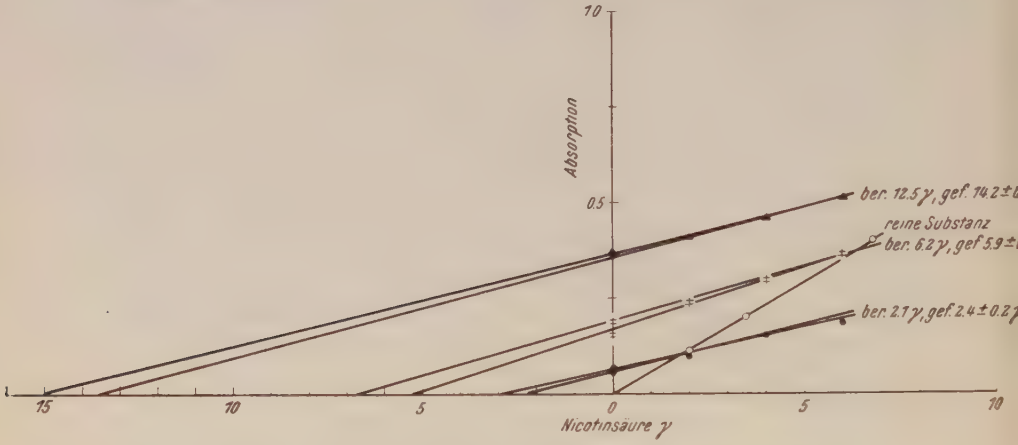


Abb. 1. Graphische Darstellung der extrapolierten Nicotinsäure-Werte.

1. Um die Methode anwenden zu können, ist es nötig, den Gehalt der zu bestimmenden Substanz annähernd zu kennen.

2. Die bekannten, zuzusetzenden Mengen der zu bestimmenden Substanz müssen ungefähr einfache Vielfache der vorhandenen zu bestimmenden Menge sein.

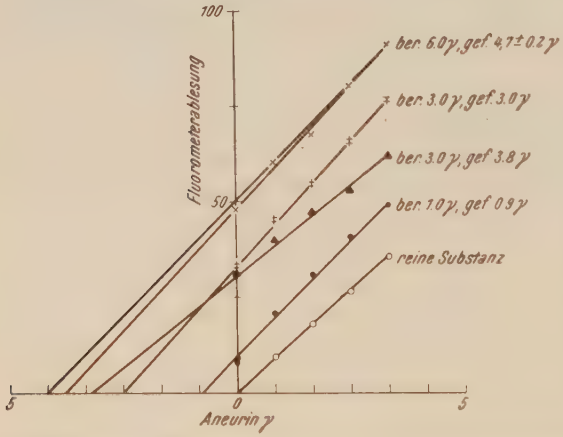


Abb. 2. Graphische Darstellung der extrapolierten Aneurin-Werte.

3. Die Extrapolation kann nur mit einer Reihe von mindestens fünf Bestimmungspunkten ausgeführt werden.

Experimenteller Teil.

Zur Bestimmung der Nicotinsäure wurde die Reaktion mit Bromcyan und Anilin nach saurer Hydrolyse verwendet[2] und die entstehende Färbung mit einem Leitzphotometer gemessen. Das Aneurin wurde bestimmt, indem es nach *Ritsert*[3] in Thiochrom übergeführt wurde, dessen Fluoreszenz nach Extraktion mit Isobutylalkohol mit Hilfe der fluorometrischen Anordnung des Spektralphotometers von *Beckmann*, Modell D. U., gemessen wurde.

Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in den Abb. 1 und 2 zusammengestellt. Aus diesen Darstellungen gehen unmittelbar die oben ausgesprochenen Schlußfolgerungen hervor.

Zusammenfassung.

Es werden einige mikroanalytisch bedeutsame Beschränkungen der Anwendungsmöglichkeit der sog. „Extrapolationsmethode" beschrieben.

Summary.

Several microanalytically significant limitations of the application possibility of the so-called "extrapolation method" are described.

Résumé.

On a décrit quelques restrictions importantes micro-analytiquement à la possibilité d'emploi de ce que l'on appelle la «méthode d'extrapolation».

Literatur.

[1] *L. J. Harris* und *W. D. Raymond*, Biochem. J. **33**, 2037 (1939).
[2] *W. Ciusa* und *W. Pasquali*, Ann. chim. appl. **36**, 167 (1946).
[3] *K. Ritsert*, Ann. Merck **1938**, 259.

Aus dem Institut für Lebensmittelchemie und biochemische Technologie der Technischen Hochschule in Graz.

Grundzüge der angewandten Mikrochemie.

Von

G. Gorbach.

(Eingelangt am 25. Juli 1950.)

Über meinen Antrag hat die Kongressleitung die Vorträge, die infolge ihrer Zahl und der Kürze der Zeit nicht in einem Hörsaal abgehalten werden konnten, nach sachlichen Gesichtspunkten geteilt und einen Hörsaal für die allgemeine Mikrochemie, den zweiten für die angewandte Mikrochemie vorbehalten. Daß wir mit dieser Teilung auf dem rechten Weg waren, zeigt die Tatsache, daß die beiden Gebiete einander bereits die Waage halten, daß ungefähr gleich viel allgemeine wie angewandt-mikrochemische Vorträge angemeldet worden sind. Es soll nun kurz die Frage beleuchtet werden, inwieweit eine Berechtigung zu dieser Zweiteilung besteht und welche Aufgaben der angewandten Mikrochemie zufallen. Ich glaube dies zunächst nicht eindringlicher tun zu können, als mit der streiflichtartigen Durchforschung der Lebensarbeit der beiden Grazer Pioniere *F. Emich* und *F. Pregl.*

Die Lebensarbeit *Emichs* war darauf ausgerichtet, die Methodik zu begründen und zu erweitern, die es ermöglicht, mit kleinen und kleinsten Substanzmengen das Auslangen zu finden. Ihm war es vor allem darum zu tun, die *Grenzen der Anwendbarkeit* bestimmter Arbeitsverfahren in Richtung kleinster Substanzmengen aufzusuchen.

So ist es nicht erstaunlich, daß *Emich* in einer eigenen und heute noch geltenden Tabelle die Empfindlichkeiten der einzelnen Reaktionen und Arbeitsverfahren aufgezeichnet hat. Es ist kein Zufall, daß von ihm das Wort „Spurensuche" stammt und er zur Erkenntnis der „Allgegenwart der Elemente" kam. Auch schienen ihm für die quantitative Auswertung mikrochemischer Methoden Waagen besonders wertvoll, die eine möglichst hohe Empfindlichkeit aufweisen. Nicht umsonst be-

mühte er sich sogar selbst um neue Wägeprinzipien, wie das der Torsionswaagen vom Typus der *Nernst*-Waage, um die elektromagnetischen Waagen, und untersuchte die Möglichkeiten der Vakuumwaagen, die durch Veränderung des Luftauftriebes kleinste Massenwägungen zulassen. Solche Waagen ermöglichten es zum Teil, praktisch bis in das Gebiet des Nonagrammes (10^{-9} g) vorzudringen. Daß solche hohe Wägegenauigkeiten mit für den Chemiker sehr wichtigen Nachteilen erkauft werden müssen, wie die geringe Belastbarkeit der Waage, die oft nur wenige Milligramme beträgt, die umständliche und zeitraubende Handhabung, die hohen Anforderungen in Hinsicht der Temperaturkonstanz und Erschütterungsfreiheit (mußten doch manche Waagen auf Fundamenten aufgestellt werden, die vom Keller aus aufragen), dies alles war *Emich* zunächst nicht so wesentlich. Er zeigte dabei eine Fülle von Möglichkeiten auf, die heute die Grundlage jedweden mikrochemischen Schaffens darstellen. Auch daß die mikrochemische Arbeit in Gefäßen und Geräten durchgeführt werden muß, die den kleinen Substanzmengen angepaßt sind, hat *Emich* gelehrt. Von ihm und seinen Schülern stammen die kleinen und kleinsten Glas- und Platingefäße, er hat die Methodik der indirekten Filtration mit Hilfe des Filterstäbchens gelehrt, und einem seiner bedeutendsten Schüler, *Julius Donau*, war es vorbehalten, uns mit der Filterschälchenmethode ein besonders elegantes und auf kleinste Substanzmengen abgestimmtes Filtrationsverfahren zu schenken. So gut wie alle Gebiete der qualitativen und quantitativen anorganischen wie organischen Mikrochemie fanden *Emich*s Beachtung.

Ganz anders war der Werdegang des Altmeisters der quantitativen organischen Mikrochemie, *Fritz Pregl*, wohl des Begründers der angewandten organischen Mikrochemie. Als medizinischer und physiologischer Chemiker war er vor die Notwendigkeit gestellt, mit dem auf mühsamem Wege gewonnenen Material sparsam umzugehen. Den unmittelbaren Anstoß zur Schaffung der Mikroelementaranalyse gaben bekanntlich seine Forschungen über die Gallensäuren. Es war nur zu natürlich, daß *Fritz Pregl* aus seiner Materialnot heraus an die Schaffung mikrochemischer Methoden dachte, um so mehr, als ja zur gleichen Zeit *Emich* Mikrochemie an der Technischen Hochschule lehrte. Bei *Emich* lernte *Pregl* die Probierwaage kennen und fand damit den Schlüssel zur Schaffung seiner Methodik. *Emich* schienen diese Waagen aus seiner Blickrichtung heraus zu wenig genau, um eine leistungsfähige Mikromethodik aufzubauen. Der angewandte Chemiker *Fritz Pregl* konnte sich dagegen bescheiden. Ihm war es wesentlich, daß er mit dieser Waage die Möglichkeit hatte, die ungefähr 10 g schweren Absorptionsgefäße auf einige Gamma genau zu wägen. Seiner Experimentierkunst gelang es auch dann binnen kürzester Zeit, jene

Mikroelementaranalyse zu schaffen, die alsbald zusammen mit der stürmischen Entwicklung der organischen Chemie und der Aufklärung der Naturstoffe ihren Siegeslauf durch die Laboratorien der ganzen Welt nahm. Die außerordentliche praktische Bedeutung seiner Arbeit brachte es mit sich, daß *Pregl* mit dem *Nobel*-Preis ausgezeichnet wurde. Wie groß die Leistung *Pregl*s war, läßt sich erst heute richtig erkennen, da die nunmehr bald 40 Jahre alte Methodik heute nahezu unverändert noch Verwendung findet. So einfach die Verbrennung von Kohlenstoff zu Kohlendioxyd, von Wasserstoff zu Wasser und deren Absorption erscheint, so groß sind die Schwierigkeiten, wenn die Analyse organischer Verbindungen mit ihren unterschiedlichen Verbrennlichkeiten richtige Ergebnisse liefern soll. Wir sehen, daß die angewandte Mikrochemie mit Recht als eigene Disziplin geführt wird. Sie bedeutet die Anpassung bekannter analytischer und präparativer Verfahren an die Mannigfaltigkeit der zu bearbeitenden Proben. Die Anpassung erfordert oft mehr Experimentierkunst als die Auffindung neuer, für die Mikroanalyse brauchbarer Methoden.

Daß die *Pregl*sche Mikroelementaranalyse manche Wünsche offen läßt, geht neben der Bedeutung dieses Verfahrens für die Praxis aus der großen Zahl der Verbesserungsvorschläge hervor. Auch im Programm unseres Kongresses sind nicht weniger als 11 Vorträge zu diesem Problem zu hören. Schon frühzeitig wurde vornehmlich von *Lindner* versucht, das Abwägen der schweren Absorptionsgefäße durch Titrationsverfahren zu ersetzen. Neuerdings zeigt *Unterzaucher*, wie über ein jodometrisches Verfahren nicht nur der bislang aus der Differenz ermittelte Sauerstoff bestimmt werden kann, sondern auch nach einem ähnlichen Verfahren der Kohlenstoff und der Wasserstoff.

Während bei der *Pregl*schen Elementaranalyse noch der Materialmangel Anlaß für die Anwendung mikroanalytischer Verfahren sein mag, hat man besonders auf dem Gebiete der Technik und der Serienuntersuchungen, wie sie auf meinem engeren Fachgebiet, der Biochemie und Lebensmittelchemie, nicht zu umgehen sind, immer mehr die Bedeutung der Zeit- und Arbeitsersparnis erkannt. Sie steht wohl im Vordergrund des Interesses, da die anfallende analytische und präparative Arbeit in der stürmischen technischen Entwicklung mit Makromethoden nicht mehr geleistet werden kann. Es ist verständlich, daß Tüpfelreaktionen, wie sie uns *Feigl* gelehrt hat, schneller durchführbar sind, als solche in Eprouvetten, Tropfen schneller titrierbar sind als 50 bis 100 Milliliter, Milligramme schneller fällbar und filtrierbar sind als Gramme. Hinsichtlich der Genauigkeit stehen Mikroanalysen den Makroanalysen nicht nach, manche Verfahren sind genauer, wie z. B. die Fettextraktionen von biologischem Material. Auch die Durchschnitts-

analyse auf mikrochemischem Wege ist mit bekannten leistungsfähigen Zerkleinerungsverfahren kein Problem mehr. So ist die Mikroanalyse in hervorragendem Maße *wegen ihrer Schnelligkeit* vielfach dazu berufen, in der täglichen Laboratoriumsarbeit eine bedeutende Rolle zu spielen, z. B. in der Betriebskontrolle, wenn es sich darum handelt, durch mikroanalytische Schnellanalysen einen Erzeugungsgang im Sinne des qualitativ besten Erzeugnisses zu lenken.

In Fortsetzung der *Emich*schen und besonders auch der *Pregl*schen Tradition konnten wir mit einer großen Schar tüchtiger Mitarbeiter gerade dieses Gebiet besonders pflegen. Es gelang dies zunächst durch Verwendung von Torsionswaagen, deren im allgemeinen geringe Belastbarkeit durch Verwendung leichter Einwägebehelfe umgangen wurde. Dies bietet den großen Vorteil rascher und einfacher Wägung. Eine Waage eigener Konstruktion dieser Art mit dennoch verhältnismäßig hoher Belastbarkeit bei hinreichender Empfindlichkeit hat die bekannte Waagenbaufirma *Sartorius* in die industrielle Erzeugung übernommen. Ihre Belastbarkeit gestattet unter Verwendung der *Donau*schen Filterschälchenmethode, auch gravimetrische Verfahren anzuwenden und alle dabei vorkommenden Wägungen durchzuführen. Das von uns entwickelte Universalheizstativ ermöglicht, alle Reaktionstemperaturen von etwa 20° bis in das Gebiet von 360° anzuwenden. Eine verschiebbare Universalklemme bietet zahlreiche Möglichkeiten für den Apparatebau. Zahlreiche Glasapparaturen ergänzen das Inventar, das nach dem Gesichtspunkt der möglichst vielseitigen Anwendbarkeit und schnellen Handhabung entwickelt worden ist. Durch genaue Beschreibung der Verfahren ist es möglich, die in Betrieben und Forschungslaboratorien vielfach üblichen Anlernkräfte mit der Durchführung mikroanalytischer Serienbestimmungen zu betrauen. Um Fehlerquellen aus dem Mißverhältnis zwischen Substanzmenge einerseits und Gewicht bzw. Oberfläche der Geräte anderseits möglichst hintanzuhalten, sind unsere Gefäße und Einrichtungen in Verfolgung allgemein üblicher Gedankengänge klein. Als besonders vielseitig anwendbares und in großem Substanzbereich brauchbares Gefäß hat sich das „Spitzröhrchen", eigentlich besser der „Spitzbecher" erwiesen. Durch Verjüngung des Bechers dem Boden zu, können Tropfen ebenso wie mehrere Milliliter in ein und demselben Gefäß bearbeitet werden.

Im übrigen sei hinsichtlich der modernen Entwicklung der angewandten Mikrochemie auf die zahlreichen Mitteilungen verwiesen, die im Rahmen des Vortragsprogramms des I. Internationalen Mikrochemischen Kongresses zur Veröffentlichung gelangen. Sie geben ein anschauliches Bild von der Bedeutung dieser Fachrichtung und von der Tatsache, daß ohne sie kaum mehr eine Sparte der Chemie auskommt.

Zusammenfassung.

Der Verfasser begründet die Berechtigung, die angewandte Mikrochemie als eigenen Zweig der mikrochemischen Wissenschaft zu führen, da die Anwendung von Mikromethoden erst nach Anpassung an die jeweils gestellten Forderungen möglich ist. Besonders eindrucksvoll wird die Bedeutung der angewandten Richtung in der Mikrochemie durch den Hinweis auf die Lebensarbeit der beiden großen Mikrochemiker *Emich* und *Pregl*.

Summary.

The writer justifies the use of applied microchemistry as an independent branch of microchemical science since the application of micromethods is possible only after adaption to the particular demands. The importance of the applied tendency in microchemistry is made especially impressive by reference to the life-work of the two great microchemists *Emich* and *Pregl*.

Résumé.

L'auteur donne des raisons pour avoir le privilège de diriger la microchimie appliquée comme une branche particulière de la science microchimique, du fait que l'usage des microméthodes n'est possible qu'après adaptation aux exigences imposées. Particulièrement impressionnante est la tendance vers la microchimie grâce à une allusion à la vie de labeur des deux grands microchimistes *Emich* et *Pregl*.

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Uppsala.

Einige Arbeiten auf dem Gebiet der quantitativen organischen Mikro-Elementaranalyse.

Von

Wolfgang Kirsten.

(Eingelangt am 11. September 1950.)

Halogenbestimmung: Mit der Halogenbestimmungsmethode, die wir früher [1, 2] veröffentlicht haben und bei der die Substanz nach *Grote-Krekeler*[3] verbrannt und merkurimetrisch nach *Dubsky* und *Trtilek*[4, 5] in alkoholischer Lösung titriert wurde, wurden so genaue Resultate erhalten, daß wir die Methode zur Analyse von Substanzmengen unter einem Milligramm verfeinern konnten. Um die Lösungsmittelmenge bei der Titration vermindern zu können, wurde ein Absorptionsgefäß konstruiert, das auf dem Prinzip von *Grote* und *Krekeler* basiert. Es ist nicht U-förmig wie das *Grote-Krekeler*-Gefäß, sondern besteht aus zwei konzentrischen Röhren. Die Verbrennungsgase treten erst in das äußere Rohr und dann durch eine Glassinterplatte im Boden des inneren Rohres in das letztere. Die Absorptionslösungsmenge ist 1,3 ml. In diesem kleinen Volumen bereitet die genaue Einstellung und Beibehaltung des p_H-Wertes während der Titration gewisse Schwierigkeiten, da sich beim Zusatz von Alkohol die Dissoziationsverhältnisse in der Lösung ändern. Diese Schwierigkeit läßt sich entweder durch Anwendung einer Korrektionskurve für die Titration oder durch Benützung einer Ultramikrobürette überwinden.

Stickstoffbestimmung: Zu dem Stickstoffbestimmungsapparat, der früher veröffentlicht wurde[6, 7], wurde ein Ultramikroazotometer konstruiert. Das Azotometer hat ungefähr dieselbe Form wie ein normales Mikroazotometer, aber an der Stelle des oberen Hahnes befindet sich ein Dreiwegehahn mit einem seitlichen Anschlußrohr. An dieses ist ein Schlauch mit einer zweiten Birne angeschlossen, die mit Quecksilber gefüllt ist. Der graduierte Teil ist kapillar und hat 0,2 ml Fassungsvermögen. Durch Heben der Birne mit Quecksilber und Öffnen des Dreiwegehahnes wird die Kapillare von oben her mit Quecksilber gefüllt.

Unter dem Quecksilber befindet sich die Lauge. Bei der Verbrennung der Substanz sammelt sich der Stickstoff unter dem Quecksilber. Dann wird die Quecksilberbirne gesenkt und der Dreiwegehahn vorsichtig geöffnet, wobei das Quecksilber in der Kapillare nach oben steigt. Die Stickstoffblase folgt mit und wenn sie in der Kapillare ist, wird der Hahn geschlossen und die Stickstoffmenge dann abgelesen. Eine genauere Veröffentlichung darüber ist im Druck[17].

Sauerstoffbestimmung nach Schütze-Unterzaucher[8, 9]: Der Fehler, der von der Reduktion von Quarz durch Substanzruß herrührt[10], konnte dadurch beseitigt werden, daß die Innenwand des Rohres durch Verkracken einer organischen Substanz mit einer Graphitschicht bedeckt wird, die die Wand vor weiteren Angriffen schützt. Da man das Schiffchen in dem undurchsichtigen Rohr nicht mehr sehen kann, würde das Hineinschieben und Herausholen Schwierigkeiten machen. Das Schiffchen wird deshalb mit Hilfe eines in Glas eingeschmolzenen Eisenkernes, an dem ein Platindraht befestigt ist, magnetisch transportiert.

Fehler treten leicht bei der Analyse von Substanzen auf, die reduzierbare Metalle enthalten. Das Metall legiert sich mit dem Platin des Schiffchens. Beim folgenden Ausglühen des letzteren wird es in Oxyd verwandelt, welches bei der nächsten Analyse reduziert wird und zu hohe Werte verursacht. Man kann in solchen Fällen oft den Fehler vermeiden, indem man das Schiffchen vor der Analyse im Wasserstoffstrom ausglüht. In vielen Fällen muß man aber das Schiffchen zuvor mit Säure auskochen (am besten konz. Schwefelsäure).

Einige Versuchsserien wurden mit der Kohlefüllung des Reaktionsrohres ausgeführt. Es zeigte sich dabei, daß die Kohlefüllung — wenigstens am Ende des Rohres — nicht körnig sein darf, sondern sie muß feinpulverig und dichtgepackt sein, sonst erhält man zu tiefe Resultate. Auch ein Rohr mit einer sehr grobkörnigen Füllung (Länge 20 cm, Durchmesser 22 mm) gab zu tiefe Resultate. Aus den Ergebnissen erhält man den Eindruck, daß die Regel von *Boudouard*[11–15], nach der das Gleichgewicht zwischen Kohlenstoff, Kohlenmonoxyd und Kohlendioxyd von der Form und Packung der Kohle unabhängig sein soll, bei der Temperatur von 1100° C nicht zutrifft. Die dichte Kohlefüllung erfordert, daß der Stickstoff unter hohem Druck steht. Wenn man die Umkehrspülung hier durch die Kohle leitete, würden die Kohleteilchen beim Stromrichtungswechsel hin- und hergerissen, was Kanalbildungen in der Kohlefüllung zur Folge hätte. Die Umkehrspülung wird deshalb vor der Kohlefüllung abgezweigt.

Ein neues Jodabsorptionsrohr wurde konstruiert, welches es ermöglicht, das Jod direkt in 2 ml Brom-Natriumacetat-Eisessiglösung aufzufangen. Dadurch wird der Umschlag bei der Titration schärfer und bei Halbmikroanalysen macht die Absorption größerer Jodmengen

keine Schwierigkeiten. Das Vortreiben von Jodkristallen mit dem Brenner in die Kalilauge fällt weg.

Schwefelbestimmung: Die kürzlich veröffentlichte Schwefelbestimmungsmethode[16] wurde weiter ausgearbeitet. Es zeigt sich, daß Phosphor und Stickstoff bei Verbrennung der Substanz Hydride bilden, von denen bei Zimmertemperatur geringe Mengen in der Lauge absorbiert werden. Wenn man das Absorptionsrohr auf einer Temperatur von 65 bis 70° C hält, werden die Hydride quantitativ ausgetrieben und stören die Titration nicht mehr. Bei der Temperatur von 1100° C wird in dem Oxydationsteil des Rohres Quarz verflüchtigt, der vom Wasserstoff zu rotem Silicium reduziert wird. Das Silicium schlägt sich im Hydrierungsteil nieder und verschmutzt das Rohr. Man muß deshalb den Oxydationsteil mit einem gesonderten Ofen auf einer Temperatur von 950° C halten. In dem wasserstoffdurchflossenen Teil wird kein Quarz von der Rohrwand reduziert, vermutlich deshalb, weil sich auf der Quarzwand ein unsichtbarer Film von nichtflüchtigem rotem Silicium bildet, der die Wand vor weiteren Angriffen schützt. Da sich bei der Reduktion ein kleiner Teil elementarer Schwefel bildet, der ein wenig zu tiefe Resultate verursacht, muß das Titrationsresultat mit einem Faktor multipliziert werden, der durch Analyse einer schwefelhaltigen Substanz empirisch bestimmt wird. Der Faktor scheint nur von der Temperatur abhängig zu sein, während Größe des Rohres und Strömungsgeschwindigkeit der Gase so gut wie keine Rolle zu spielen scheinen. Er wurde bei 1160° C zu 1,03, bei 1200° C zu 1,02, bei 1220° C zu 1,01 bestimmt.

Da 1 mg Schwefel bei der Titration zirka 25 ml 0,01-n-Thiosulfat verbraucht, ist die Methode sehr empfindlich und kann gut zur Analyse von Substanzmengen unter 1 mg benützt werden. Wir benützen einen Sauerstoffstrom von 25 ml/min und einen Wasserstoffstrom von 80 ml/min. Der schnelle Sauerstoffstrom macht auch die schnelle Verbrennung von großen Substanzmengen möglich, was die Methode auch für Halbmikro- und Mikroanalysen und besonders für Spurenbestimmungen geeignet macht.

Bei der Schwefelbestimmung in anorganischen Substanzen wird die Substanz mit Phosphorpentoxyd gemischt oder überschichtet. Beim Erhitzen treibt das Phosphorpentoxyd den Schwefel aus. Auf diese Weise kommt jedoch eine große Menge Phosphorpentoxyd in das Rohr. Ein kleiner Teil desselben wird zu rotem Phosphor reduziert, welcher zu hohe Resultate verursachen würde. Man muß deshalb bei solchen Analysen ein Phosphorabsorptionsrohr vor das eigentliche Absorptionsrohr schalten, in dem sich der Phosphor niederschlägt. Bei der Analyse von Bariumsulfat als Testsubstanz wurden folgende empirische Faktoren gefunden:

1100° C	1,07
1150° C	1,05
1200° C	1,04
1220° C	1,035

Diese Faktoren sind höher als jene, welche bei der Analyse organischer Substanzen gefunden wurden. Wir sind im Begriff die Ursache hierfür zu untersuchen.

Für die Analyse anorganischer Substanzen benützt man am besten ein altes Verbrennungsrohr, da es unmöglich scheint, die Phosphorsäure aus dem Rohr wieder zu entfernen. Das Rohr kann dann nur für die Analyse anorganischer Substanzen weiterverwendet werden.

Genauere Einzelheiten über die im vorstehenden behandelten Methoden werden nach Abschluß der Arbeiten veröffentlicht werden.

Zusammenfassung.

Die Verfeinerung einer Chlor- und Brombestimmungsmethode für Einwaagen unter 1 mg, ein neues Ultramikroazotometer und einige Fehlerquellen und Verbesserungen an der Sauerstoff-Bestimmungsmethode nach *Schütze-Unterzaucher* werden behandelt. Die neue Schwefel-Bestimmungsmethode durch Hydrierung nach vorhergehender Verbrennung wurde weiter ausgearbeitet und die Resultate werden mitgeteilt. Die Methode scheint für die Ultramikro-, Mikro- und Halbmikroanalyse und vor allem für die Spurenanalyse von Schwefel in organischen und anorganischen Substanzen geeignet zu sein.

Summary.

The paper discusses: the refinement of a method of determining chlorine and bromine in samples below 1 mg; a new ultramicro-azotometer; several sources of error and improvements in the *Schütze-Unterzaucher* method of determining oxygen. The new method for determining sulfur by hydrogenation after previous combustion was further developed and the results are given. The method appears to be suitable for the ultramicro-, micro-, and semimicro analysis, and especially for the determination of traces of sulfur in organic and inorganic substances.

Résumé.

On traite de la mise au point d'une méthode de dosage du chlore et du brome pour des prises d'essai de l'ordre du mg, d'un nouvel ultramicro-azotomètre, de quelques causes d'erreurs et de perfectionnements à la méthode de dosage de l'oxygène d'après *Schütze-Unterzaucher*. La nouvelle méthode de dosage du soufre par hydrogénation après combustion préalable a été, d'autre part, perfectionnée et les résultats communiqués. La méthode paraît être convenable pour l'ultramicro, la micro et la semimicro et pour toutes les analyses de traces de soufre dans les substances organiques et minérales.

Diskussion.

H. *P. Gouverneur* (Amsterdam, Holland): Aus einer vorläufigen Mitteilung des Vortragenden in der Zeitschrift „Mikrochemie" ist mir bekannt, daß bei der Sauerstoffbestimmung in sauerstoffarmen Substanzen bzw. in Kohlenwasserstoffen zu hohe Resultate erhalten werden. Ist dieser Fehler schon beseitigt? Nach unserer Erfahrung verschwindet dieser Fehler, wenn man statt der jodometrischen Arbeitsweise das Kohlendioxyd gravimetrisch bestimmt. Wir nehmen an, daß der Fehler durch die Instabilität des Jodpentoxyds gegenüber dem Wasserstoff der Pyrolysegase verursacht ist.

H. *W. Kirsten:* Durch Verkracken einer geeigneten organischen Substanz wird die Innenwand des Verbrennungsrohres mit einer Graphitschicht bedeckt, die die Quarzwand vor weiteren Angriffen schützt. Durch dieses Verfahren war es uns möglich, nun auch bei sauerstoffarmen Substanzen gute Resultate zu erhalten.

Literatur.

[1] *W. Kirsten*, Sv. kem. tidskr. **56**, 248 (1944).
[2] *W. Kirsten*, Mikrochem. **34**, 149 (1949).
[3] *W. Grote* und *H. Krekeler*, Z. angew. Chem. **46**, 106 (1933).
[4] *J. V. Dubsky* und *J. Trtilek*, Mikrochem. **12**, 315 (1933).
[5] *J. V. Dubsky* und *J. Trtilek*, Mikrochem. **15**, 302 (1934).
[6] *W. Kirsten*, Analyt. Chemistry **19**, 925 (1947).
[7] *W. Kirsten*, Analyt. Chemistry **22**, 358 (1950).
[8] *M. Schütze*, Z. analyt. Chem. **118**, 241 (1939).
[9] *J. Unterzaucher*, Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 391 (1940).
[10] *W. Kirsten*, Mikrochem. **34**, 151 (1949).
[11] *O. Boudouard*, C. r. acad. sci., Paris **128**, 824 und 1524 (1899).
[12] *Th. F. E. Rhead* und *R. V. Wheeler*, J. Chem. Soc. London **97**, 2178 (1910).
[13] *Th. F. E.* und *R. V. Wheeler*, J. Chem. Soc. London **99**, 1140 (1911).
[14] *D. W. Hubbard* und *W. J. Rees*, Trans. Ceram. Soc. **28**, 277 (1929).
[15] *H. C. Woltereck*, C. r. acad. sci., Paris **147**, 460 (1908).
[16] *W. Kirsten*, Mikrochem. **35**, 174 (1950).
[17] *W. Kirsten*, Analyt. Chemistry, im Druck.

Aus dem Untersuchungslaboratorium der Badischen Anilin- und Soda-Fabrik, Ludwigshafen a/Rh.

Die gleichzeitige Bestimmung von Stickstoff und Wasserstoff in organischen Substanzen.

Von

Bernhard Wurzschmitt.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 28. August 1950.)

Im „*Pregl-Roth*“[1] ist über die gemeinsame Mikrobestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff folgendes zu lesen: „Die *Pregl*sche Universalrohrfüllung gestattet uns heute, jede beliebige Substanz korrekt zu verbrennen, weil sich gezeigt hat, daß das Bleisuperoxyd trotz mancher unangenehmer Eigenschaften ein absolut verläßliches Mittel für die Zerlegung höherer Oxyde des Stickstoffs darstellt.“ „Das Bleisuperoxyd ist das heikelste Reagens und war daher schon wiederholt Gegenstand eingehender Untersuchungen.“ „Es bleibt somit das Bleisuperoxyd trotz seiner unangenehmen Eigenschaft, Wasser vorübergehend aufzunehmen und Kohlendioxyd in trockenem Zustand zu absorbieren, wobei letzteres in Gegenwart geringer Wassermengen wieder abgegeben wird, noch das einzige Mittel, mit dessen Hilfe wir Substanzen jeder Zusammensetzung mit Sicherheit analysieren können.“ „Von der Füllung des Verbrennungsrohres wird im allgemeinen lediglich das Bleisuperoxyd Fehler verursachen.“ *Lindner*[2] untersuchte eingehend die durch das Bleidioxyd bedingten Fehlermöglichkeiten und sagt: „Der Einfluß des Bleisuperoxyds auf die Wasser- oder Wasserstoff-Bestimmung ist allgemeiner und unter gewöhnlichen Umständen schwerer wiegend als jener auf die Kohlenstoff-Bestimmung, in der Art seines Zustandekommens aber einfacher und leichter zu überblicken. Die Feststellungen über die fehlerhaften Nebenwirkungen des Bleisuperoxyds und über sein Vermögen, die Stickoxyde aufzunehmen, führen bei der Nutzanwendung auf die Elementaranalyse zu sich schwer widersprechenden Forderungen. Dies läßt eine Umgehung des Bleisuperoxyds in der Mikro-Elementaranalyse als ernste und dringliche Forderung erscheinen. Es ist eine wesentliche Voraussetzung für den erfolgreichen Übergang zu Substanzmengen unter 3 bis 4 mg. Es wäre aber unstreitig auch bei größeren Substanzmengen ein Gebot der Zweckmäßigkeit, wenigstens im Falle stickstofffreier Körper mit Rohrfüllungen ohne Bleisuperoxyd zu arbeiten.“ Ähnlich äußerten sich schon früher *Weygand*[3], *Boetius*[4] und *Friedrich*[5]. *Willits* und *Ogg*[6] sind der Meinung, daß, wenn man Mikrochemiker befrage, welchen Teil der Mikroanalyse man in seiner

Entwicklung zu Standardmethoden besonders fördern solle, diese nahezu einstimmig die weitere Erforschung der Kohlenstoff-Wasserstoff-Bestimmung fordern würden, obwohl diese eine der ältesten und meist benutzten Mikromethoden ist.' Zusammenfassend kann man wohl mit *Lindner*[7] sagen: „In der Gangbarkeit der Kohlenstoff-Wasserstoff-Bestimmung liegt der Beweis, daß sich die Einflüsse des Bleisuperoxyds bei Einhaltung der erprobten Vorschriften hinreichend ausgleichen lassen, zweifellos aber stellen sie eine der wichtigsten Quellen von Ungenauigkeiten dar."

Es ist deshalb auch nicht verwunderlich, daß sich eine Reihe von Autoren in den letzten Jahren bemüht haben, das Bleidioxyd aus der Kohlenstoff-Wasserstoff-Bestimmung auszuschalten. So berichten *Belcher* und *Philippes*[8] vom Ersatz des Bleidioxyds durch Absorber mit flüssiger Füllung (Kaliumbichromat oder Kaliumpermanganat in Schwefelsäure) zwischen Wasser- und Kohlendioxyd-Absorptionsröhrchen. Hopcalite als Trockenabsorbens für Stickoxyde bei Zimmertemperatur schlägt *Corwin*[9] vor. *Benett*[10] wendet eine 180 mm lange Schicht metallischen Kupfers als Ersatz des Bleidioxyds an und verbrennt im Stickstoffstrom, der vorher zur Aufnahme kleiner Mengen Sauerstoff durch Wasserstoffperoxyd geleitet und getrocknet wird. Ebenfalls im Stickstoffstrom, aber ohne kleine Mengen Sauerstoff, arbeiten unter Ausschaltung von Bleidioxyd durch reduziertes Kupfer *Niederl* und *Withmann*[11]. Statt mit Bleidioxyd hält *Dombrowski*[12] die Stickoxyde mit Aminoazobenzol zurück. *Irimescu* und *Popescu*[13] benützten dazu Kieselgel getränkt mit einer Lösung von Diphenylamin in Schwefelsäure. Im Luftstrom mit einer großen Schicht metallischen Kupfers ohne Bleidioxyd verbrennt *Unterzaucher*[14]. *Wagner*[15] schließlich verwendet Bleidioxyd nur bei stickstoffhaltigen Substanzen. Es befindet sich in einem leicht auswechselbaren Ansatzstück zum Verbrennungsrohr.

Das Bleidioxyd und alle diese zu seinem Ersatz vorgeschlagenen Maßnahmen wären an sich nur bei stickstoffhaltigen Substanzen erforderlich und könnten bei stickstofffreien entfallen. In ihnen wäre dann der Kohlenstoff und der Wasserstoff viel einfacher und mit größerer Genauigkeit zu bestimmen. Um aber eine einzige Universal-Kohlenstoff-Wasserstoff-Bestimmungsmethode zu haben, hat man sich seit 119 Jahren daran gewöhnt, den Kohlenstoff und den Wasserstoff gemeinsam zu bestimmen und verbrennt dabei seit 72 Jahren auch stickstofffreie Substanzen mit Bleidioxyd trotz dessen bekannter Nachteile.

Ich fragte mich deshalb, ob die bisherige Methode, die Bestimmung des Wasserstoffs in allen Fällen, d. h. auch bei stickstoffhaltigen Substanzen, mit der des Kohlenstoffs zu koppeln, zweckmäßig sei, und mußte diese Frage verneinen. In stickstoffhaltigen Substanzen wird man in der Regel sowieso eine Stickstoffbestimmung ausführen, und es blieb daher zu untersuchen, ob man nicht die Wasserstoffbestimmung

mit der des Stickstoffs koppeln kann. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen klar auf der Hand. Bei der Stickstoffbestimmung nach *Dumas* muß ja ebenfalls vollständige Verbrennung des Kohlenstoffs zu Kohlendioxyd und des Wasserstoffs zu Wasser erfolgen, weil sonst die Stickstoffwerte nicht richtig ausfallen könnten. Bei stickstoffhaltigen Substanzen sich bildende Stickoxyde müssen aus demselben Grunde restlos zerstört werden, was aber hier mit Kupfer bestens gelingt. Es erschien mir deshalb ohne weiteres möglich, die Bestimmung des Stickstoffs und des Wasserstoffs gemeinsam in einem Analysengang auszuführen, wenn man zwischen das Ende des Verbrennungsrohres und das Mikroazotometer einfach ein Absorptionsröhrchen für das gebildete Wasser schaltet und durch einen vom Langbrenner her erhitzten Metallblechstreifen dafür sorgt, daß alles Wasser in das Absorptionsröhrchen getrieben wird. Schon der erste Versuch war ein voller Erfolg, und auch bei den weiteren Versuchen habe ich kein einziges Fehlresultat erhalten. Die benutzte Apparatur war eine mikroautomatische, bei der der Langbrenner elektrisch, der bewegliche Brenner mit Gas beheizt ist. Die Verbrennung erfolgte im geschlossenen Rohr mit Druckausgleichsgefäß nach *Zimmermann*[16]. In Abweichung von der normalen Stickstoffanalyse wurde zwischen Kohlendioxydentwickler (feste Kohlensäure in Dewarflasche) und Verbrennungsrohr eine Waschflasche mit konz. Schwefelsäure und anschließend ein Absorptionsröhrchen mit Phosphorpentoxyd-Bimsstein zur Trocknung des Kohlendioxyds geschaltet und das Verbrennungsrohr statt mit Kupferoxyd-Kupfer-Kupferoxyd mit Kupferoxyd/Silberbimssteingemisch-Kupfer-Kupferoxyd/Silberbimssteingemisch zur Zurückhaltung von Halogenen und Schwefel beschickt. Als Mischrohr wurde, um den Korkstopfen* zu vermeiden, ein solches mit eingeschliffenem Glasstopfen verwendet.

In zahlreichen Parallelbestimmungen mit alter Kohlenstoff-Wasserstoffbestimmung und der von mir ausgearbeiteten neuen Mikro-Stickstoff-Wasserstoff-Bestimmung[17] habe ich festgestellt, daß die Bestimmung des Wasserstoffs nach der neuen Methode eine wesentlich kleinere Fehlergrenze aufweist. Die Werte fallen ohne Korrektur gegenüber der Theorie meist (etwa 0,1% o) zu hoch aus. Dieser positive Blindwert rührt, wie ich fand, von den kleinen Spuren Luftfeuchtigkeit her, die das ausgeglühte Kupferoxyd für die bewegliche Füllung bei der Herstellung der Mischung mit der Analysensubstanz und ihrer Einfüllung in das Verbrennungsrohr aufnimmt. Man könnte dies vermeiden, wenn man, statt zu mischen, im Schiffchen oder in der Kapsel und mit Rückspülung (Umkehrspülung) arbeiten würde, wie sie zuerst von *Dexheimer*[18] und später von *Gysel*[19] für die Stickstoffbestimmung

* Fehlerquelle für den Wasserstoff.

nach *Dumas* empfohlen wurde. In dem bei dem neuen Verfahren unbedingt erforderlichen, absolut trockenen Kohlendioxyd verbrennen aber schwer verbrennliche Substanzen im Schiffchen nicht restlos und die Kapselmethoden erschienen mir zu kompliziert. *Unterzaucher*[20] hat zwar vorgeschlagen, schwer verbrennliche Substanzen für die bloße Stickstoffbestimmung im Schiffchen und in durch Perhydrol (mit etwas Platin*) geleitetem, also Sauerstoff *und* Wasser enthaltendem Kohlendioxyd zu verbrennen. Kohlendioxyd mit — in diesem Falle natürlich zu trocknendem — Sauerstoff wollte ich mit Rücksicht auf die längere Haltbarkeit der Kupferschicht im Verbrennungsrohr aber vermeiden und außerdem ist, wie ich fand, gerade das Wasser wesentlicher als der Sauerstoff. Wasser aber konnte bei meiner Stickstoff-Wasserstoff-Bestimmung selbstverständlich nicht angewendet werden. So entschloß ich mich, beim Mischungsverfahren, das sich übrigens sehr gut bewährt hat, zu bleiben.

Es wurde nämlich weiter gefunden, daß der diese kleinen Überwerte bedingende Blindwert, wie erwartet, von der relativen Luftfeuchtigkeit im Arbeitsraum abhängt, und zwar, wie sehr viele Versuche ergaben, nach nebenstehender Tabelle. Diese wurde so gewonnen, daß vollständige Blindverbrennungen genau nach Vorschrift, aber ohne Substanzeinwaage bei verschiedenen, stark auseinander liegenden relativen Luftfeuchtigkeiten durchgeführt und die erhaltenen Blindwerte in einem Koordinatensystem gegen die Luftfeuchtigkeit aufgetragen wurden. Es ergab sich dabei ab 45% Luftfeuchtigkeit eine Gerade.

Tabelle 1.

% Relative Luftfeuchtigkeit	Blindwert bzw. Korrektur am Wassergewicht in γ
80	95
75	80
70	65
65	50
60	35
55	20
50	5
45	0
darunter	0

Die Lage der Geraden im Koordinatensystem ist naturgemäß etwas abhängig von der Arbeitsweise:

1. *Bei der Vorbereitung und Aufbewahrung des feinen Kupferoxyds für die bewegliche Füllung.*

Kupferoxyd p. a. in Drahtform (Merck, Darmstadt) wird in einer Porzellanreibschale durch leichtes Drücken und Stoßen (nicht Reiben) mit dem Pistill zerkleinert und durch ein DIN-Sieb Nr. 1171 mit lichter Maschenweite von 0,075 mm gesiebt. Der Durchgang durch dieses Sieb bildet das *feine Kupferoxyd*. Es wird in einem elektrischen

* Die von *Unterzaucher* zuerst für die N-Bestimmung vorgeschlagene Verwendung von Platin-Perhydrol zur Entwicklung von feuchtem Sauerstoff wurde dann von *A. Benett*[21] zur Kohlenstoff-Wasserstoff-Bestimmung im getrockneten, sauerstoffhaltigen Stickstoffstrom benützt.

Muffelofen bei 800° C eine halbe Stunde (vom Erreichen der sichtbaren Rotglut an noch 20 Min.) geglüht. Höhere Temperaturen und längere Glühzeiten sind, um das Zusammenbacken des Kupferoxyds zu vermeiden, nicht anzuwenden. Nach dem Erkalten an der Luft trocknet man noch 1 bis 2 Stunden bei 120° C im Trockenschrank nach und läßt dann im Exsikkator erkalten. Für den Gebrauch füllt man sich aus dem so vorbereiteten Vorrat, den man im Exsikkator aufhebt, jeweils etwa einen Tagesbedarf in ein kleines Pulverfläschchen mit Glasschliffstöpsel ab. Der Stöpsel wird nach Entnahme von Kupferoxyd jeweils sofort wieder aufgesetzt.

Der Rückstand auf dem DIN-Sieb Nr. 1171, Maschenweite 0,075 mm wird durch ein DIN-Sieb 1171, von der lichten Maschenweite 0,09 mm gesiebt. Der Durchgang durch dieses Sieb ist das *grobe Kupferoxyd* für die Herstellung der später beschriebenen bleibenden Rohrfüllung. Der Rückstand auf diesem Sieb wird wiederum in der Reibschale zerkleinert und weiter wie beschrieben behandelt.

2. *Beim Mischen der Substanz mit feinem Kupferoxyd im Mischrohr und der Einführung der Mischung in das Verbrennungsrohr.*

Die in der Korrekturtabelle angegebenen Korrekturwerte beziehen sich auf die Verwendung von nach obiger Vorschrift hergestelltem feinem Kupferoxyd und auf folgende weitere Arbeitsweise: Das Verbrennungsrohr wird nach einer beendigten Verbrennung nicht vollständig erkalten gelassen. Man nimmt es vielmehr bereits zirka 15 Min. nach dem Ausschalten des Langofens (es hat dann in der bleibenden Füllung noch eine Temperatur von ungefähr 150 bis 200° C) aus dem Ofen, entleert die bewegliche Füllung der vorhergehenden Analyse in ein Vorratsgefäß (dessen Inhalt nach Bedarf, wenn nötig durch Auskochen mit Essigsäure von Alkali befreit, nach obiger Vorschrift ausgeglüht und wieder verwendet wird) und beschickt es in üblicher Weise mittels des Mischrohres mit der neuen beweglichen Füllung und der zu analysierenden Substanz.

Man arbeitet bei der Mischung und bei der Beschickung gleichmäßig und fließend, um möglichst wenig und vor allen Dingen immer dieselbe Zeit für diese Manipulation zu verbrauchen. *Sofort* nach dem Einlegen des beschickten Rohres in den Verbrennungsofen wird der Langofen eingeschaltet und mit Kohlendioxyd gespült, so daß schon während des Spülens die bleibende Füllung erhitzt und die von ihr während der Füllung aufgenommene Feuchtigkeit ausgetrieben wird. Sollten an einer anderen Stelle infolge individueller Unterschiede, z. B. infolge des Arbeitstempos, die hier angegebenen Korrekturwerte nicht zutreffen, so müssen diese für die betreffende Apparatur und den sie Bedienenden durch einige Blindwerte bei verschiedenen relativen Luftfeuchtigkeiten ermittelt werden.

Neben dem für die Stickstoffbestimmung erforderlichen Thermometer und Barometer hängt in meinem Mikrolaboratorium schon immer auch ein gutes Hygrometer. Entsprechend der dort nach Beginn der Analyse abgelesenen relativen Luftfeuchtigkeit erfolgt dann durch Interpolation der nebenstehenden Tabelle der Abzug am gefundenen Wassergewicht, wenn man auf einen möglichst genauen Wasserstoffwert Gewicht legt. Erforderlich ist dies jedoch für die übliche Genauigkeit nicht, wie die nachfolgenden Beleganalysen zeigen:

Tabelle 2.

Substanz[1]	Einwaage in mg	Auswaage an Wasser in mg	% Relative Luftfeuchtigkeit	Korrektur in Gamma	Gefunden % H ohne Korrektur	Gefunden % H mit Korrektur	% H Theorie[2]	Gefunden % N	% N Theorie[2]
Harnsäure	3,914	0,880	60	35	2,51	2,42	2,38	33,29	33,33
Acetanilid	6,525	3,955	76	83	6,78	6,64	6,67	10,58	10,37
Unbekannt; schwer verbrennlich ...	7,065	1,810	45	0	2,86	—	2,91	17,48	17,41
Naphthalin	2,022	1,180	59	32	6,53	6,35	6,29	0	0
Unbekannt	6,542	3,335	35	0	5,70	—	5,70	10,16	9,85
Unbekannt	7,110	6,910	35	0	10,87	—	10,76	13,53	13,52
Naphthalin	2,243	1,300	57	26	6,48	6,35	6,29	0	0
Unbekannt	7,035	8,000	62	41	12,72	12,66	12,60	7,98	7,96
Pikrat	6,120	2,440	74	77	4,46	4,32	4,22	18,71	18,65
Acetanilid	5,685	3,450	60	35	6,79	6,72	6,67	10,48	10,37*
Unbekannt	6,580	6,240	50	5	10,61	10,60	10,56	8,65	8,69
Acetanilid	7,465	4,540	76	83	6,80	6,68	6,67	10,46	10,36
Flüssigkeit	8,816	9,100	76	83	11,55	11,45	11,40	6,84	6,80
Unbekannt	9,115	9,140	44	0	11,22	—	11,27	3,25	3,06
Unbekannt	4,857	2,365	44	0	5,44	—	5,42	5,44	5,41
Unbekannt	6,700	3,990	44	0	6,66	—	6,80	5,75	5,67
Acetanilid	5,340	3,300	75	80	6,91	6,75	6,67	10,55	10,37*
Flüssigkeit	9,470	7,465	45	0	8,82		8,72	12,59	12,67
Stearinsäure ...	6,280	7,140	70	65	12,72	12,61	12,77	0	0
Heliogenblau ..	6,376	1,960	72	71	3,43	3,32	3,36	18,29	18,36
Paraffinöl, rein .	5,630	7,340	72	71	14,58	14,45	14,50	0	0
Acetanilid	4,957	3,002	70	65	6,77	6,62	6,67	10,29	10,37*
Dimethylaether	3,790	4,500	70	65	13,28	13,09	13,13	0	0
Glykokoll	6,050	3,698	69	62	6,83	6,72	6,66	18,72	18,65
Chrysen	7,372	3,560	70	65	5,40	5,30	5,30	0	0
Pyren.....	6,784	3,140	74	87	5,17	5,05	4,99	0	0
Pikrinsäure	5,390	0,680	58	29	1,41	1,35	1,31	18,32	18,33
Pikrinsäure	6,283	0,750	44	0	1,33	—	1,31	18,45	18,33
Äthylenoxyd ...	6,336	5,200	65	50	9,18	9,10	9,16	0	0
Acetanilid	6,426	3,860	67	56	6,72	6,63	6,67	10,41	10,36*
Acetanilid	7,540	4,545	65	50	6,74	6,67	6,67	10,56	10,36

Fortsetzung der Tabelle 2.

Substanz[1]	Einwaage in mg	Auswaage an Wasser in mg	% Relative Luftfeuchtigkeit	Korrektur in Gamma	Gefunden % H		% H Theorie[2]	Gefunden % N	% N Theorie[2]
					ohne Korrektur	mit Korrektur			
Acetanilid	6,212	3,700	36	0	6,66	—	6,67	10,43	10,36
Acetanilid	6,872	4,095	52	11	6,66	6,65	6,67	10,40	10,36*
2-Aminofluoren	6,695	3,700	58	29	6,18	6,14	6,12	7,97	7,73
2-Aminofluoren	5,480	3,028	60	35	6,18	6,11	6,12	7,81	7,73
Acetanilid	5,082	3,018	44	0	6,65	—	6,67	10,35	10,37
Sulfanilsaures Natrium. $2H_2O$	6,550	2,600	62	41	4,44	4,37	4,36	6,05	6,06
Hämoglobin Merck	5,974	3,745	45	0	7,01	—	7,03	14,47	14,39
Nitranilin	5,465	2,200	60	35	4,50	4,43	4,38	20,22	20,28
Hexachloräthan	12,780	0,125	80	95	0,11	0,03	0,00	0	0,00
Harnstoff	3,283	2,050	75	80	6,99	6,71	6,72	46,69	46,64
Hexamethylen-tetramin	3,570	2,850	70	65	8,93	8,73	8,63	40,12	39,97
Thioharnstoff ..	4,147	2,058	70	65	5,55	5,38	5,30	36,70	36,83
Flüssigkeit	10,487	10,280	60	35	10,97	10,93	10,90	0	0
Arsacetin[3]	6,645	2,860	65	50	4,82	4,73	4,85	3,82	3,97
Jodoform	13,290	0,340	75	80	0,29	0,21	0,26	0	0
Jodoform	10,360	0,375	80	95	0,40	0,30	0,26	0	0
Jodoform	*2,800*	0,115	60	35	0,46	0,32	0,26	0	0
Hämin reinst ..	6,765	3,080	75	80	5,09	4,96	4,95	8,53	8,59
Tribromphenol .	11,580	1,130	80	95	1,09	1,00	0,91	0	0
Tribromphenol .	*2,835*	0,300	65	50	1,18	0,99	0,91	0	0
Tribromanilin .	11,285	1,375	70	65	1,36	1,30	1,22	4,15	4,25
Tribromanilin .	*3,878*	0,500	65	50	1,44	1,29	1,22	4,36	4,25

[1] Unter den Analysensubstanzen befanden sich sehr schwer verbrennliche, sehr leicht flüchtige, explosive, chlor- und schwefelhaltige, stickstofffreie, Eisen-, Kobalt- und Kupferkomplexe.

[2] Bei den unbekannten Substanzen, die aus unseren internen Analysenaufträgen stammten, bedeuten die unter „Theorie" angegebenen Zahlen die nach den bisher üblichen Methoden gefundenen Mittelwerte.

[3] Natrium acetylarsanilicum + 4 H_2O (DAB 6).

Aus der Tabelle ist deutlich zu ersehen, wie genaue Werte die neue Methode liefert. Man kann die normale Verbrennungszeit sogar ruhig um das Doppelte überschreiten und erhält trotzdem dieselben, sehr nahe bei der Theorie liegenden Werte. Dies ist z. B. bei den mit einem * versehenen Analysen der Fall gewesen. Wenn man auch im allgemeinen Analysenmethoden ohne Blindwert und ohne Korrektur den Vorzug gibt, so ist die Korrektur in diesem Fall in ihrer Ursache genau aufgeklärt, für jeden einzelnen Fall berechenbar und deshalb durchaus so berechtigt, wie z. B. die bei der *Pregl*schen Mikro-*Dumas*-Methode.

Beschreibung der Apparatur.

Der elektrisch (Betriebsspannung aus Sicherheitsgründen 42 Volt) beheizte Langofen* ist 160 mm lang und hat zur Beobachtung der Temperatur und zur rascheren Abkühlung einen abnehmbaren Deckel. Auf der Azotometerseite trägt er eine Vorrichtung, um genügend Ofenwärme auf ein Silberblech zu übertragen, das über den Schnabel des Verbrennungsrohres, den Schlußhahn und einen Teil des Wasserabsorptionsröhrchens hinweg ragt. Das Verbrennungsrohr aus Quarz (Bergkristall) ist ohne Schnabel 550 mm lang, der Schnabel 15 mm. Sein äußerer Durchmesser beträgt 10 mm, sein innerer 8 mm. Es liegt so im Langofen, daß 10 bis 15 mm des Rohres, vom Schnabelansatz an gerechnet, aus dem Ofen herausragen. Zwischen Druckausgleichgefäß und Kohlendioxydentwickler sind zur vollständigen Trocknung des Kohlendioxyds eine kleine Waschflasche mit konz. Schwefelsäure und anschließend ein Phosphorpentoxyd-Bimssteinröhrchen geschaltet. Der Kapillarschnabel des Rohres ist durch Schlauchverbindung mit einem *Kapillar*hahn mit *kurzen* Schenkeln verbunden. An dessen dann noch freien Schenkel wird das gewogene Wasserabsorptionsröhrchen (Phosphorpentoxyd-Bimsstein) und an dieses in üblicher Weise das Mikroazotometer angeschlossen. Versuche zeigten, daß von der Kalilauge des Mikroazotometers her keine Wasseraufnahme im Wasserabsorptionsröhrchen stattfindet. Es ist deshalb nicht nötig, aber möglich, ein ungewogenes Wasserabsorptionsröhrchen zwischen Mikroazotometer und gewogenes Wasserabsorptionsröhrchen zu schalten. Das Ofengestell mit Spindel zum automatischen Antrieb des mit Gas beheizten beweglichen Brenners ist 450 mm lang. Der mit einem Aufsatz von 40 mm Länge, 3 mm Schlitzbreite und mit einem Brennerdach versehene Brenner ist gegen das Druckausgleichgefäß mit dem rechten Ende des Brenneraufsatzes bis auf 50 mm vom Rohranfang (Endstellung) ausfahrbar und hat von da aus eine Laufzeit von 15 Min. bis zum Langofen. Der bewegliche Brenner — es kann selbstverständlich auch ein entsprechend dimensionierter elektrischer Brenner verwendet werden — muß im leeren Rohrinnern eine Temperatur von mindestens 750 bis 800° C bewirken. Die bleibende Rohrfüllung besteht, von der Azotometerseite her gesehen, aus: Etwas Kupferdrahtnetz, 60 mm Kupferoxyd-Silberbimssteingemisch (9 : 1), 50 mm reduziertem Kupfer, 70 mm Kupferoxyd-

* Über seine Konstruktion, Automatik und Druckausgleichgefäß vgl. *W. Zimmermann*[16]. Das neue Verfahren der gemeinsamen Stickstoff- und Wasserstoffbestimmung ist aber weder an die Mikro-Ausführung noch an eine besondere Ofenkonstruktion noch an die Automatik gebunden, sondern kann auch als Makro- bzw. Halbmikromethode und auch mit von Hand betriebenem beweglichem Brenner oder automatischem Einzelantrieb durchgeführt werden.

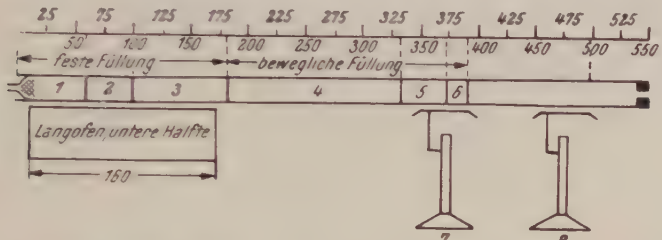
Silberbimssteingemisch (9 : 1). Zur Herstellung von Silberbimsstein wird auf Hirsekorngröße gesiebter, frisch ausgeglühter Bimsstein mit einer heißen, nahezu gesättigten Silbernitratlösung getränkt. Nach gründlichem Abtropfenlassen des Überschusses wird sofort bei 110° C getrocknet und dann in einem Muffelofen bei 800° C geglüht, bis keine Stickoxyde mehr entweichen[16]. Das bei der oben beschriebenen Herstellung des feinen Kupferoxyds gleichzeitig gewonnene grobe Kupferoxyd wird* in einem Nickeltiegel zur Rotglut erhitzt und dann in einem mit *reinem* Methanol beschickten Porzellantiegel geschüttet. Der Porzellantiegel wird mit einer Tiegelzange gehalten und langsam geschüttelt, bis alles Methanol abgebrannt ist. Nach dem Abkühlen an der Luft wird das reduzierte Kupfer in einer Vorratsflasche aufgehoben. Die bleibende Rohrfüllung wird durch den Langofen auf 650 bis 700° C geheizt. Bei sehr leicht flüchtigen Substanzen, die im Rohr geöffnet werden müssen, wie z. B. Dimethyläther (Sp. —23° C), Methylamin (Sp. —6° C) oder Äthylenoxyd (Sp. + 13,5° C), empfiehlt es sich, die Temperatur auf etwa 750° C zu steigern.

Ausführung der Analyse.

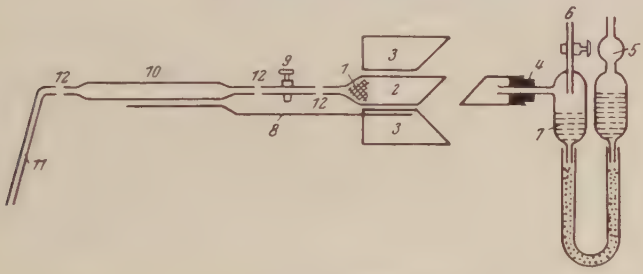
Die gewogene Analysensubstanz wird in üblicher Weise mittels eines mit Glasschliffstöpsel versehenen Mischröhrchens mit der beweglichen Füllung in das abgekühlte Verbrennungsrohr eingebracht. Das rechte Ende der beweglichen Füllung soll nicht mehr als 200 mm vom Langofen entfernt sein. Dabei sollen die letzten 40 mm keine Substanz mehr enthalten. Hierauf folgt noch eine oxydierte Kupferdrahtnetzspirale von 20 mm Länge zum Festhalten der beweglichen Füllung. Nunmehr wird das Rohr mit dem Überdruckgefäß verbunden und der Kohlendioxydstrom und dann *sofort* der Langbrenner eingeschaltet. Nach zirka 3 Min. hat der Langbrenner die nötige Temperatur erreicht und das Rohr ist genügend gespült. Jetzt werden Wasserabsorptionsröhrchen und Mikroazotometer angeschlossen. Schon nach ganz kurzer Zeit treten im Mikroazotometer Mikroblasen auf. Dann werden beide Hähne (Abschlußhahn am Rohrende und Hahn zum Kohlendioxydentwickler) geschlossen und der bewegliche Brenner so unter das Verbrennungsrohr geschoben, daß die rechte Kante des Brennerdaches mit dem rechten Ende der 20-mm-Kupferspirale abschließt, und angezündet. Nach etwa 1 Min. hat das Rohrinnere Rotglut erreicht. Der automatische Brennervorschub wird eingeschaltet. Nach etwa 11 Min. hat der bewegliche Brenner den Langofen erreicht. Er wird abgeschaltet (gelöscht). Nunmehr bewirkt man durch Senken des rechten Quecksilbergefäßes Druckausgleich, öffnet zunächst den Schlußhahn und dann auch den zum

* Soweit nicht zur Herstellung des Kupferoxyd-Silberbimssteingemisches verwendet.

Kohlendioxydentwickler. Die Strömungsgeschwindigkeit des Kohlendioxyds wird schon vor Beginn der Verbrennung durch einen Quetschhahn so eingestellt, daß kein Stecken der Blasen im Azotometer stattfindet. Der Brenner wird jetzt ganz in seine *End*stellung gebracht (50 mm vom Rohranfang entfernt) und wieder angezündet. Es ist dabei nötig, ihn nur langsam (etwa innerhalb 1 bis 2 Min.) auf volle



1 = 60 mm Kupferoxyd Silberbimsstein 9:1, *2* = 50 mm reduziertes Kupfer, *3* = 70 mm wie 1, *4* = Substanz Kupferoxydgemisch, *5* = Kupferoxyd, *6* = Oxydierte Kupferdrahtnetzspirale, *7* = Beweglicher Brenner, Ausgangsstellung für Vorverbrennung, *8* = Beweglicher Brenner, Ausgangsstellung für Nachverbrennung.



1 = Etwas Kupferdrahtnetz, *2* = 60 mm Kupferoxyd/Silberbimsstein, *3* = Elektrischer Langofen, *4* = Rohrende mit Gummistopfen und CO_2-Einleitung, *5* = Aktive Kohle zur Hg-Dampfabsorption, *6* = Zum CO_2-Entwickler, *7* = Druckau-gleichsvorrichtung mit Hg, *8* = In den Ofen hineinreichender Silberblechstreifen, *9* = Schlußhahn, *10* = H_2O-Absorptionsröhrchen, *11* = Zum Mikroazotometer, *12* = Gummischlauchverbindungen. *Anmerkung:* Der Maßstab (mm) gilt nur für die Längenmaße.

Abb. 1.

Kraft zu bringen, um durch den Druckanstieg kein Stecken der Blasen zu bewirken. Dann wird die Automatik wieder eingeschaltet. Diesmal braucht der bewegliche Brenner für den längeren Weg bis zum Langofen 15 Min. Während dieser Zeit wird das Rohr bereits gespült und vor allem das zurückkondensierte Wasser wieder vorgetrieben. Hat der bewegliche Brenner den Langofen erreicht, wird er gelöscht und nunmehr noch 10 Min. mit Kohlendioxyd gespült. Gleichzeitig mit dem Abnehmen des Azotometers und des Wasserabsorptionsröhrchens wird der Langofen ebenfalls abgeschaltet, der Abschlußhahn geschlossen und der Deckel zur rascheren Abkühlung abgenommen. Gesamtdauer der

Verbrennung: 44 Min. Behandlung des Azotometers und des Wasserabsorptionsröhrchens wie üblich. Nach dem Einfüllen der Analysensubstanz in das Verbrennungsrohr wurde die relative Luftfeuchtigkeit im Arbeitsraum abgelesen. Man entnimmt aus der Tabelle die Anzahl Gamma Wasser, die dementsprechend von dem gewogenen Wasserwert in Abzug gebracht werden. Einzelheiten der Apparatur s. Abb. 1*.

Vorteile der neuen Methode.

Man könnte die Korrektur, wie schon oben erwähnt, vermeiden, wenn man nicht nach dem Mischverfahren, sondern nach dem Schiffchen- oder Kapselverfahren mit Rückspülung und gegebenenfalls mit Zumischung von wenig Sauerstoff zum Treibgas (Kohlensäure) arbeiten würde. Die Methodik ginge dann aber ihrer bestechenden Einfachheit verlustig. Angesichts der neuerdings immer komplizierter und damit teurer werdenden Apparaturen wollte ich nämlich eine apparativ möglichst einfache Methodik schaffen, die für die meisten praktisch vorkommenden Fälle ausreicht. Es ergibt sich dann für große Industrielaboratorien, die nicht auf bestimmte Produkte und deren Analysen spezialisiert sind, von selbst eine praktische Zweiteilung: Für die Fälle, in denen höchste Genauigkeit (± einige Hundertstel Prozent) für den Gehalt an Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff usw. notwendig ist, steht eine diesen Anforderungen entsprechende Spezialapparatur, die dann meist auch kompliziert und teuer ist, zur Verfügung. Das Gros der Analysen aber, für das diese extreme Genauigkeit nicht erforderlich ist, wird in möglichst einfachen Apparaturen erledigt. Die neu vorgeschlagene Mikro-Stickstoff-Wasserstoff-Analyse ist zugleich ein Beispiel dafür, wie man eine größere Genauigkeit als bisher auch mit einfachen Maßnahmen erzielen kann. Sie macht die bisherige Mikro-C-H-Apparatur mit ihrem schwachen Punkt, der Hohlgranate und dem Bleidioxyd überflüssig und gestattet, diese Methode nun auch sehr einfach zu gestalten. Man muß dabei dann zwei Fälle unterscheiden:

1. *Die Analysensubstanz enthält keinen Stickstoff.*

Ich verbrenne diese Substanzen im Schiffchen im üblichen Kohlenstoff-Wasserstoff-Rohr mit seitlicher Treibgaszuführung und Kupferoxyd-Silberbimssteingemisch als Rohrfüllung. Treibgas ist trockener Sauerstoff. Als Verbrennungsofen wird *derselbe Ofen* wie für die neue Stickstoff-Wasserstoff-Bestimmung verwendet. Ebenso sind die Automatik und der Vorschub des beweglichen Brenners dieselben. Die

* Neu gefüllte Verbrennungsrohre im CO_2-Strom ausglühen und wie auch nach jeder Analyse bei geschlossenem Abschlußhahn im CO_2-Strom erkalten lassen. Da das H_2O-Absorptionsröhrchen mit CO_2 gefüllt gewogen wird, bei Ingebrauchnahme (Vorwägung) mit CO_2 füllen.

Bremskapillare kann in Wegfall kommen, ein Druckregler genügt. Die damit erhaltenen Werte für den Kohlenstoff und Wasserstoff sind sehr genau.

2. *Die Analysensubstanz enthält Stickstoff.*

Durch die neu beschriebene Methode hat man in diesem Falle den Wasserstoffwert bereits mit dem Stickstoffwert erhalten. Man kann dann den Kohlenstoffwert durch nasse Verbrennung bestimmen, deren Methoden durch das neue Analysenverfahren eine größere Anwendung und vielleicht auch noch eine zuverlässigere Ausgestaltung erfahren dürften. Ich selbst ziehe es bis dahin vor, mit folgendem neu entwickeltem Verfahren der trockenen Verbrennung zu arbeiten: Bei diesem sind der Ofen, die Automatik, das Verbrennungsrohr, die Rohrfüllung und die Verbrennungstechnik nach dem Mischverfahren genau dieselben, wie oben für die neue Stickstoff-Wasserstoff-Bestimmung beschrieben. Treibgas ist in diesem Falle Stickstoff, der durch eine Waschflasche mit Wasser mit Wasserdampf beladen wird. Der Wasserdampf bewirkt eine vollständige Verbrennung auch sog. schwer verbrennlicher Körper. Die Verbrennung wird zunächst ebenfalls im geschlossenen Rohr durchgeführt*. Dann erfolgt eine Nachverbrennung im feuchten Stickstoffstrom. Vor das gewogene Kohlendioxydabsorptionsröhrchen ist ein nicht gewogenes Wasserabsorptionsröhrchen vorgeschaltet. Die erhaltenen Kohlenstoffwerte sind ebenfalls sehr genau.

Genaue Arbeitsvorschriften sowie Beleganalysen für diese beiden Methoden werde ich in Kürze mitteilen.

Für diese Anfang März 1950 begonnene Arbeit wurden die zahlreichen Versuchsanalysen, von denen die mitgeteilten Beleganalysen nur einen kleinen Teil darstellen, von den Herren *L. Schlindwein*, *R. Beckmann* und *E. Karl* ausgeführt, denen ich auch an dieser Stelle für ihre geschickte und zuverlässige Mitarbeit herzlich danke.

Zusammenfassung.

1. Bei der bisher üblichen gemeinsamen Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff mußte auf das Auftreten von Stickoxyden bei stickstoffhaltigen Analysensubstanzen Rücksicht und deshalb die Hohlgranate und die Bleidioxydfüllung mit ihren Schwächen in Kauf genommen werden, um auch in diesen Fällen richtige Werte für den Kohlenstoff zu erhalten.

2. Es wurde deshalb eine neue Methode entwickelt, deren Prinzip darin besteht, bei stickstoffhaltigen Analysensubstanzen so zu verfahren, daß einerseits statt der gemeinsamen Bestimmung des Kohlen-

* Die von mir hiermit zum ersten Male für die Kohlenstoffbestimmung vorgeschlagene Verbrennung im geschlossenen Rohr scheint sehr viele Vorteile zu bieten.

stoffs und Wasserstoffs nunmehr der Stickstoff und der Wasserstoff in einfachster Weise nebeneinander und in einer gesonderten Verbrennung nur der Kohlenstoff bestimmt werden. Für die Bestimmung des Kohlenstoffs und des Wasserstoffs in stickstofffreien Substanzen ergibt sich dadurch dann eine sehr einfache Methodik, die denselben Verbrennungsofen benützt.

3. Die gemeinsame Bestimmung des Stickstoffs und des Wasserstoffs einerseits und die des Kohlenstoffs anderseits in stickstoffhaltigen Substanzen erfolgt nach der neuen Methode in ein und derselben Apparatur, mit derselben Rohrfüllung und derselben Verbrennungstechnik. Nur das Treibgas ist verschieden: Im ersten Falle trockenes Kohlendioxyd, im zweiten Falle feuchter Stickstoff.

Summary.

In order to avoid the errors which are caused by employing lead dioxide for the purpose of absorbing nitrogen oxides during the analysis in which the percentage of carbon and hydrogen is determined the author suggests instead the simultaneous destination of nitrogen and of hydrogen in the course of the usual destination of nitrogen by inserting a small absorption tube for water between the combustion pipe and the microazotometer. The first is charged with a mixture of copper oxide and pumice coated with silver and a middle layer of copper. In this manner the determination of carbon in nitrogenous substances as well the determination of carbon and hydrogen in nitrogen-free substances is decidedly simplified and simultaneously rendered more exact.

Résumé.

Pour éviter les sources d'erreurs causées par le bioxyde de plomb, employé comme agent d'absorption pour les oxydes d'azote, lors du dosage simultané du carbone et de l'hydrogène, l'auteur propose de procéder au dosage simultané de l'azote et de l'hydrogène suivant la méthode habituelle pour le dosage de l'azote, en intercalant entre le tube de combustion et le microazotomètre un tube d'absorption pour l'eau. Le tube de combustion est rempli d'un mélange de pierre ponce argenté et d'oxyde de cuivre avec couche médiane de cuivre métallique. Le dosage du carbone dans les substances azotées ou le dosage du carbone et de l'hydrogène dans les substances non-azotées se trouvent ainsi très simplifiés et plus exacts.

Literatur.

[1] *F. Pregl*, Quantitative organische Mikroanalyse, 6. Auflage, neubearbeitet von Dr. *H. Roth*, Springer-Verlag Wien 1949. S. 16, 36, u. 66.

[2] *J. Lindner*, Mikro-maßanalytische Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs mit grundlegender Behandlung der Fehlerquellen in der Elementaranalyse. Verlag Chemie, Berlin 1935. S. 159, 181 u. 182.

[3] *C. Weygand*, Quantitative analytische Mikromethoden der organischen Chemie in vergleichender Darstellung. Akadem. Verlagsges., Leipzig 1931.

[4] *M. Boetius*, Über die Fehlerquellen bei der mikroanalytischen Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs nach der Methode von *Fritz Pregl*. Verlag Chemie, Berlin 1931.

[5] *A. Friedrich*, Die Praxis der quantitativen organischen Mikroanalyse. Franz Deuticke, Leipzig und Wien 1933.
[6] *C. O. Willits* and *C. L. Ogg*, Analyt. Chemistry **22**, 268 (1950).
[7] *J. Lindner*, Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 1494 (1930).
[8] *R. Belcher* and *D. F. Philippes*, Bios No. 1606 (British Intelligence Objectives Sub-Committee).
[9] *A. H. Corwin*, 94th meeting, Am. Chem. Soc. Sept. 9 (1937).
[10] *A. Benett*, Analyst **74**, 188 (1949).
[11] *J. B. Niederl* und *B. Withman*, Mikrochem. **11**, 274 (1932).
[12] *A. Dombrowski*, Mikrochem. **28**, 125 und 136 (1940).
[13] *J. Irimescu* und *B. Popescu*, Z. analyt. Chem. **128**, 185 (1948).
[14] *J. Unterzaucher*, Chem. Ing. Technik **22**, 39 (1950).
[15] *H. Wagner*, Mikrochem. **36/37**, 634 (1950).
[16] *W. Zimmermann*, Mikrochem. **31**, 42 u. 149 (1943).
[17] *B. Wurzschmitt*, Chem. Ztg. **74**, 419—423 (1950).
[18] *L. Dexheimer*, Z. analyt. Chem. **58**, 13 (1919).
[19] *H. Gysel*, Helv. Chim. Acta, **22**, 1088 (1939).
[20] *J. Unterzaucher*, Z. angew. Chem. **61**, 432 (1949) und Chem. Ing. Technik **22**, 128 (1950).
[21] *A. Bennet*, Analyst **74**, 188 (1949).

Aus dem Mikrolaboratorium des I. Chemischen Laboratoriums der Universität Wien.

Zur Ausführung der Mikrostickstoffbestimmung nach Dumas.

Von

Adolf Dirscherl und **Herbert Wagner.**

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 22. Juni 1950.)

Parallel zu seinen Arbeiten über die Kohlenstoff-Wasserstoff-Analyse hat schon *K. Horeischy* († 1945) in unserem Laboratorium eine modifizierte Stickstoffbestimmung nach *Dumas* entworfen und bearbeitet, zum Teil gemeinsam mit *F. Bühler*, der nach 1945 die Methode eingehend geprüft und weiter entwickelt hat. Auf Grund dieser Fortschritte führten wir weitere Untersuchungen aus, die zu einigen Abänderungen und Vereinfachungen Anlaß gaben und die sich in jetzt schon längerem Gebrauch (zirka 1200 Analysen) gut bewährten.

In dieser Mitteilung soll über die gesamte hier jetzt dauernd benützte Methodik berichtet werden.

I. Apparatur.

a) Ein einwandfrei arbeitender *Kohlendioxydentwickler* ist eine Grundbedingung für das klaglose Arbeiten der Apparatur. Die sauberste Kohlendioxydquelle, der Kohlensäureschnee[1, 2], ist nur bei Serienanalysen wirtschaftlich. Auch die thermische Zersetzung von Karbonaten[3], etwa von Magnesiumkarbonat, liefert ein äußerst reines Gas, jedoch ist diese Darstellung nicht gerade bequem. Verwendet man einen *Kipp*schen Apparat, der mit Marmor und Salzsäure beschickt ist, so muß man den Marmor vorher zerkleinern und entlüften; außerdem soll die Salzsäure nicht mit der Außenluft in Berührung kommen. Im einfachsten Fall kann man dies durch Hintereinanderschalten zweier *Kipp*scher Gasentwickler erreichen[5], doch ist diese Anordnung wegen des großen Raum-

bedarfes ziemlich unhandlich. In der Literatur sind außerdem mehrere Gasentwickler beschrieben, die der Forderung nach luftfreier Salzsäure Rechnung tragen[6, 7, 8].

Wir verwenden mit bestem Erfolg die in Abb. 1 dargestellte Konstruktion von *K. Horeischy*, die auch nach längeren Ruhepausen sofort tadellose Mikroblasen liefert. Die Salzsäure steht in diesem Apparat unter einem Kohlendioxydüberdruck von 10 bis 150 Torr; die Regelung erfolgt durch ein Überdruckventil.

b) Das *Verbrennungsrohr* aus Supremaxglas ist 540 mm lang, bei einem Innendurchmesser von 9 mm; das Kohlendioxyd wird von der Seite zugeführt. Als Verschluß des Rohres an diesem Ende dient ein gut sitzender Gummistopfen. Die Rohrleitung vom *Kipp*schen Apparat zum Verbrennungsrohr ist zirka 1,5 m lang, um die bei der Verbrennung in der geschlossenen Apparatur zeitweise zurücksteigenden Krackgase aufnehmen zu können; wir verbrennen analog der Methode von *Zimmermann* bei geschlossenem Azotometerhahn H_2. In diese Rohrleitung ist ein mit 5%iger Cadmiumsulfatlösung beschickter Blasenzähler und ein kleines mit Marmor gefülltes U-Rohr eingebaut.

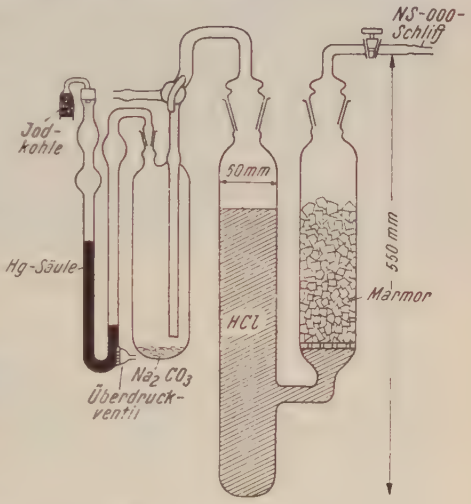


Abb. 1. *Kipp*scher Apparat nach *K. Horeischy*.

Die Cadmiumsulfatlösung hält Spuren von Schwefelwasserstoff zurück, die aus mit Sulfiden verunreinigtem Marmor in Freiheit gesetzt werden, und die wir selbst bei ausgesucht schönen Stücken manchmal nachweisen konnten. Dieser Umstand macht sich, wie schon *A. F. Richter*[9] beschrieben hat, bei den Analysen störend bemerkbar.

Das andere Ende des Verbrennungsrohres trägt einen NS-000-Kernschliff, mit dem über eine Glasrohrspirale und einen fein regulierbaren Dreiweghahn H_2 die Verbindung zum Azotometer hergestellt ist. Sämtliche Einzelteile der Apparatur sind durch NS-000-Schliffe verbunden, die je nach ihrer Verwendung entweder gefettet oder mit *Königs*chem Glaskitt gedichtet sind.

c) Als *Azotometer* verwenden wir das Modell von *A. Müller*[10]. Es gestattet ein sehr sauberes Arbeiten, da die beim *Pregl*schen Azotometer unvermeidliche Verunreinigung der Kalilauge mit Gummiteilen vermieden wird.

Der Glasstift zur Feineinstellung des Laugenmeniskus ist jedoch nicht unbedingt erforderlich. Es genügt, die Lauge im seitlichen Rohr etwas unterhalb des Niveaus im kalibrierten Rohr grob einzustellen, worauf man nur die Hand an das untere Vorratsgefäß zu legen braucht, um die Feineinstellung durch die thermische Ausdehnung zu bewirken. Das in der Literatur beschriebene Kleben der Blasen am Quecksilber konnten wir durch Schütteln des Metalles mit Äther jederzeit beheben[11].

d) Die Rohrfüllung besteht wie üblich aus einem bleibenden und einem beweglichen Teil. Als *bleibende* Füllung dient ein Silberwollepfropfen am Ende des Verbrennungsrohres, daran anschließend 100 mm Kupferoxyd, 40 mm frisch reduziertes Kupfer und abermals 80 mm Kupferoxyd*. Den Abschluß bildet ein Quarzwollepfropfen. Die daran anschließende *bewegliche* Füllung besteht aus zwei oxydierten Kupferdraht-Netzrollen von je 75 mm Länge, die eine *vor*, die andere *hinter* dem Verbrennungsgefäß. Sie sind durch Einrollen von gewöhnlichen käuf-

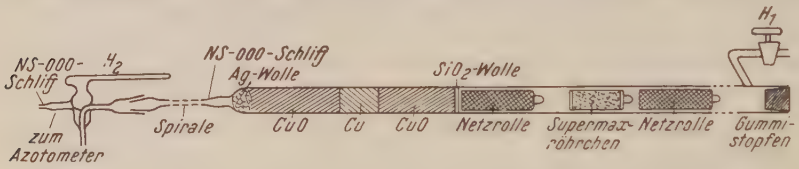


Abb. 2. Schematische Darstellung des Verbrennungsrohres.

lichen Kupferdrahtnetzen leicht anzufertigen und tragen an ihrem einen Ende eine Schlinge aus Cekasdraht, an der sie mühelos mit einem Haken herausgezogen werden können; der Durchmesser der Rollen ist so gewählt, daß sie sich ohne Widerstand in das Rohr einführen lassen. Die bewegliche Füllung läßt sich also hier ohne das lästige Herausnehmen des ganzen Verbrennungsrohres erneuern, so daß man ohne Unterbrechung analysieren kann (Rohrfüllung Abb. 2).

e) Wir beheizen mit *elektrischen Öfen*. Der bewegliche kleine Ofen (70 mm lang) hat eine Temperatur von etwa 710° und wird durch einen Synchronmotor automatisch so vorgeschoben, daß er zum Durchlaufen der Verbrennungsstrecke etwa 20 Minuten benötigt. Der große feststehende Ofen ist 270 mm lang; seine Temperatur beträgt 700°. Um von Änderungen der Netzspannung unabhängig zu sein, verwenden wir einen Transformator mit Additionsschaltung und einen Schiebewiderstand.

II. Besondere Erfahrungen und Verbrennungsschema.

Feste Substanzen werden in ein 60 mm langes Supremaxröhrchen eingewogen; es muß ohne Reibung in das Verbrennungsrohr einzuführen sein. An dem einen Ende trägt das Röhrchen eine Öse. Als Verschluß dient ein zirka 2 mm starker Quarzwollepfropfen. Das Röhrchen wird

* Präparat „Kupferoxyd in Drahtform zur Elementaranalyse".

zu einem Drittel mit *feinem Kupferoxyd* gefüllt, darauf die Substanz mit Hilfe eines Einwägeröhrchens nach *Lieb-Krainick* eingewogen, und bis zu zwei Drittel mit feinem Kupferoxyd aufgefüllt. Nun wird das noch offene Ende des Röhrchens ebenso mit einem Quarzwollepfropfen verschlossen und die Substanz durch Schütteln des Röhrchens mit dem feinen Kupferoxyd innig gemischt. Substanzverlust tritt nach unseren Erfahrungen bei dieser Manipulation nicht ein.

Bei Versuchen mit *an der Luft ausgeglühtem* feinem Kupferoxyd traten Blindwerte auf; man muß daher nach der Luftoxydation im *Kohlendioxydstrom* erkalten lassen. Dieselbe Erscheinung, sogar in verstärktem Ausmaß, zeigte sich bei den als bewegliche Füllung dienenden Kupferdrahtnetzrollen, wenn man sie an der Luft mit der oxydierenden Bunsenbrennerflamme ausglüht und erkalten läßt. Auch diese müssen zur Ausschaltung des Blindwertes anschließend im Kohlendioxydstrom erkalten, was in der im folgenden gegebenen Arbeitsvorschrift berücksichtigt ist. Die Größe der Blindwerte schwankt zwischen 0,01 und 0,06 ml. Ihr Auftreten geht wohl auf Adsorption von Luftstickstoff in den Spalten, Kapillaren oder ähnliches zurück, die den feinen Kupferdraht durchziehen. Dieser adsorbierte Stickstoff wird beim Spulen mit Kohlendioxyd bei Zimmertemperatur vom Kupferoxyd zurückgehalten, dagegen beim Erhitzen abgegeben, wodurch der Blindwert bewirkt wird. Läßt man jedoch im Kohlendioxydstrom erkalten, wird der Blindwert automatisch ausgeschaltet[12, 13, 14].

Bereits vor der Einwaage hat man eine frisch oxydierte Drahtnetzrolle in die heiße Zone des großen Ofens geschoben. Während des Einwägens leitet man einen mäßigen Kohlendioxydstrom durch die Apparatur, wobei die adsorbierten Gasreste von der erhitzten Rolle abgegeben werden. Nun wird die Rolle in den kalten Teil des Rohres zurückgezogen und dort auskühlen gelassen. Anschließend wird die Rolle aus dem Rohr genommen, eine zweite, noch nicht blindwertfrei gemachte, bis zur bleibenden Füllung vorgeschoben, dahinter das Supremaxröhrchen mit der Substanz eingebracht und als Abschluß die nunmehr blindwertfreie Kupferoxyd-Drahtnetzrolle. Nach dem Verschließen der Apparatur mit dem Gummistopfen wird das Verbrennungsrohr mit Hilfe einer leergepumpten Manometerflasche bei Hahn H_2 durch abwechselndes Öffnen und Schließen des Hahnes an der Manometerflasche und des Hahnes H_1 evakuiert und jeweils Kohlendioxyd aus dem *Kipp*schen Apparat nachströmen gelassen. Nach dreimaliger Wiederholung erhält man in den meisten Fällen einwandfreie Mikroblasen.

Flüssige oder flüchtigere Substanzen, bei denen man auf das Evakuieren verzichten muß, werden in ein Silberschiffchen eingewogen und mit feinem Kupferoxyd überschichtet. Flüssige flüchtige Substanzen wägt man in Kapillaren ein, und verbrennt ebenfalls im Silberschiffchen.

Der nun folgende Verbrennungsvorgang zerfällt in zwei Teile:

1. Eigentliche Verbrennung bei geschlossenem Hahn H_2 durch automatisches Vorrücken des beweglichen Ofens und weitgehende

thermische Zersetzung der organischen Substanz. Dieser Vorgang nimmt 20 Minuten in Anspruch.

2. Übertreiben der gebildeten Verbrennungsprodukte durch Öffnen von Hahn H_2, wobei drei bis vier Blasen pro Sekunde in das Azotometer eintreten. Ausschalten des kleinen Verbrennungsofens. Um die bleibende Füllung nicht zu sehr zu beanspruchen, ist es zweckmäßig, diese Blasenfrequenz nicht zu überschreiten. Die Gesamtdauer einer Analyse beträgt etwa 40 Minuten. Erhöhte Blasengeschwindigkeit, daher kürzere Dauer der Analysen, ist jedoch, wie eingehende Untersuchungen bewiesen, ohne Einfluß auf die Ergebnisse.

Nach Beendigung der Analyse wird Hahn H_2 geschlossen, die rückwärtige Kupferoxyddrahtnetzrolle und das Supremaxröhrchen werden entfernt und die vordere heiße Rolle wird in den kalten Teil des Rohres gezogen. Sie dient bei der folgenden Bestimmung als rückwärtiger, blindwertfreier Teil der beweglichen Rohrfüllung, während als vorderer Teil eine frisch oxydierte Kupferdrahtnetzrolle eingeschoben wird.

Der durchschnittliche Fehler aus 300 Testverbrennungen beträgt 0,07% absolut. Abweichungen über $\pm$ 0,15% absolut sind sehr selten.

Zusammenfassung.

Es wird eine modifizierte Mikrostickstoffapparatur beschrieben, bei der mit Hilfe elektrischer Öfen und einer Automatik verbrannt wird. Als Kohlendioxydquelle wird ein abgeänderter *Kipp*scher Apparat vorgeschlagen, der auch nach längeren Ruhepausen sofort einwandfreie Mikroblasen liefert. Die bewegliche Füllung besteht aus zwei leicht zu handhabenden Kupferoxyddrahtnetzrollen, die serienmäßiges Arbeiten erleichtern. Als Einwaage- und Verbrennungsgefäß dient ein beiderseits durch Quarzwollepfropfen verschließbares Röhrchen aus Supremaxglas.

Summary.

A modified micro nitrogen apparatus is described: the combustion is made in an electric furnace and an automatic device is included. A modified Kipp apparatus is suggested as the carbon dioxide source; it delivers satisfactory micro-bubbles even after lengthy periods of idleness. The movable filling consists of two copper oxide gauze rolls, which are easily manipulated; they make it possible to run series of analyses. A small tube constructed of Supremaxglass, and closed at both ends by quartz wool stoopers, is used as the wrigling tube and combustion vessel.

Résumé.

On décrit un appareil modifié pour le microdosage de l'azote, au moyen d'un four électrique et d'un dispositif automatique de combustion. Comme source de gaz carbonique, on présente un appareil de Kipp modifié, qui, après de longues périodes de repos, conduit aussitôt à un microdégagement irréprochable. Le remplissage mobile est formé de deux rouleaux de toile

de cuivre oxydée, bien maniables, qui permettent de faciliter des travaux en série. Comme pèse-substance et récipient de combustion, on se sert d'un petit tube en verre Supremax, fermé des deux côtes avec des tampons de laine de quartz.

Literatur.

[1] *W. Zimmermann*, Mikrochem. **31**, 42 (1943).
[2] *W. Kirsten*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **19**, 925 (1947).
[3] *E. Berl* und *H. Burkhardt*, Ber. dtsch. chem. Ges. **59**, 897 (1926).
[4] *A. Friedrich*, Mikrochem. **10**, 356 (1932).
[5] *A. Friedrich*, Die Praxis der quantitativen organischen Mikroanalyse. Franz Deuticke, Leipzig und Wien, 1933, S. 60.
[6] *F. Hein*, Z. angew. Chem. **40**, 864 (1927).
[7] *A. Friedrich*, Mikrochem. **10**, 355 (1932).
[8] *W. Poethke*, s. *C. Weygand*, Quantitative analytische Mikromethoden der organischen Chemie, Akademische Verlagsgesellschaft Leipzig, 1931, S. 36.
[9] *A. F. Richter*, Mikrochem. **30**, 226 (1942).
[10] *A. Müller*, Mikrochem. **33**, 192 (1948).
[11] *O. R. Trautz*, Mikrochem. **9**, 300 (1931).
[12] *F. Böck* und *K. Beaucourt*, Mikrochem. **6**, 69 (1928).
[13] *B. Flaschenträger*, Z. angew. Chem. **39**, 717 (1926).
[14] *Shintaro Ogawa*, Sci. Rep. Tôhoku Imp. Univ. **16**, 667 (1927); durch Chem. Zbl. **1928 I**, 380.

Aus dem Mikrolaboratorium des I. Chemischen Laboratoriums der Universität Wien.

Bemerkungen zur Kohlenstoff-Wasserstoffbestimmung.

Von

Herbert Wagner.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 22. Juni 1950.)

In der Arbeit von *K. Horeischy, I. Dreher* und *O. Hoffmann-Ostenhof*[1] wurde die bis Herbst 1945 in unserem Laboratorium ausgearbeitete und benützte Anordnung und Arbeitsweise beschrieben. In der Folgezeit haben *F. Bühler** und *O. Flunt*[2] zahlreiche kritische Versuche ausgeführt sowie Verbesserungen vorgeschlagen. Diese Entwicklungsarbeit war die Ausgangsbasis für die im folgenden beschriebenen apparativen Änderungen, die zu der seit Anfang 1949 mit durchwegs befriedigendem Erfolg benützten Arbeitsweise geführt haben.

I. Allgemeines und Apparatives.

Durch eine unter II näher zu besprechende Alterung kann man zwar die bekannt unangenehmen Eigenschaften des Bleidioxyds etwas verbessern; trotzdem befriedigen die Wasserstoffwerte nicht restlos. Daher wurde versucht, bei allen Substanzen, außer bei stickstoffhaltigen, auf das Bleidioxyd zu verzichten. Da jedoch aus äußeren Gründen eine Aufstellung von *zwei* Apparaturen (eine mit, eine ohne Bleidioxyd in der Rohrfüllung) nicht in Frage kam und es nicht zweckmäßig erschien, mit zweierlei verschieden gefüllten Verbrennungsrohren zu arbeiten, das heißt sie jeweils auszutauschen, wurde ein Verbrennungsrohr *mit zwei Ansatzstücken* hergestellt. Seine Form und Füllung zeigt Abb. 1. Das Supremaxverbrennungsrohr 1 (480 mm lang), mit seitlicher Sauerstoffzufuhr, läuft in eine Kapillare 2 aus, in die der Bremspfropfen ein-

* Derzeit U. S. A., Long Beach, „Benjamin Franklin", Franklin Blvd., L. I., N. Y.

gestopft wird; 3 ist ein Kernschliff, auf den die Schliffhülsen der zwei Ansatzstücke (Abb. 2) passen. Der Bremspfropfen wurde hierher verlegt, um einen Überdruck an der Stelle zu vermeiden, an der sich ein Schliff befindet.

Die beiden Ansatzstücke (Abb. 2) sind 150 mm lang; an ihrem rückwärtigen Ende befindet sich eine Schliffhülse, die auf den Kern des

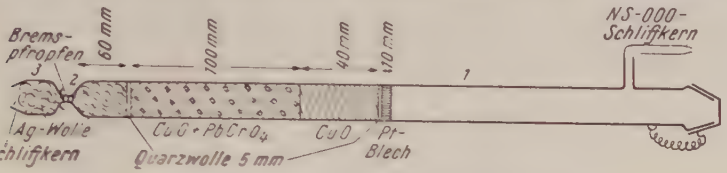


Abb. 1. C-H-Verbrennungsrohr und Rohrfüllung.

Verbrennungsrohres paßt, am vorderen Ende ist ein NS-000-Schliffkern auf eine kurze Kapillare aufgeschmolzen.

Ein ursprünglich verfolgter Gedanke, an das Ende des Verbrennungsrohres einen NS-000-Schliffkern zu setzen, an den entweder das bleidioxydgefüllte Ansatzstück oder direkt die Absorptionsgefäße geschaltet werden, wurde fallen gelassen, da man das Ansatzstück durch das kleine Lumen der NS-000-Schliffhülse hindurch nicht füllen kann.

Das *Ansatzstück* für die Verbrennung *stickstofffreier* Substanzen ist bis auf einen Silberdraht, der sich von der Kapillare an der Mündung bis gegen das rückwärtige Ende spiralförmig windet, leer; er soll eine Wärmeübertragung bis in den Schliff gewährleisten.

Das *Ansatzstück* für die Verbrennung *stickstoffhaltiger* Substanzen wird gefüllt, wie Abb. 2 zeigt. Die beiden Silberwollebäuschchen und der Silberdraht sorgen wieder für Wärmeübertragung, die Quarzwolle hält das Bleidioxyd fest.

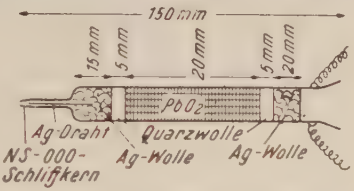


Abb. 2. Bleidioxydgefülltes Ansatzstück.

Wesentlich ist, daß in der Ausbuchtung des Verbrennungsrohres nach der Bremspfropfkapillare ein *Silberwollebausch* angebracht wird, um zu verhindern, daß dort Wasser kondensiert.

Weiterhin muß der große Verbrennungsofen nahe genug an den Bremspfropfen herangeschoben sein, so daß eine gute Wärmeleitung durch das Silber möglich ist, damit der Bremspfropfen sich nicht durch Kondenswassertröpfchen verstopft, was anfangs bei wasserstoffreichen Substanzen beobachtet werden konnte.

Der obere Teil der Schliffverbindung Verbrennungsrohr—Ansatzstück wird leicht gefettet.

Über das Ansatzstück, gleich ob mit oder ohne Füllung, wird der elektrisch geheizte Bleidioxydofen geschoben, so daß nirgends Wasser kondensieren kann.

Da Bleidioxyd beim Liegen an der Luft bekanntlich Feuchtigkeit anzieht, verwahrt man das gefüllte Ansatzstück bei Nichtgebrauch in einem evakuierten Pistolenexsikkator, so daß es dauernd verwendungsbereit ist.

Die Kapillare zur Aufnahme des Bremspfropfens ist am rückwärtigen Ende verengt, so daß der Bremspfropfen nach der Füllung des Verbrennungsrohres und während des Durchströmens von Sauerstoff bei angeheiztem großen Ofen von der Mündung her gestopft werden kann.

Wir benützen nur die von *Horeischy* und Mitarbeitern[1] beschriebenen elektrischen Öfen. Die Temperatur des großen Ofens soll 700° betragen; bei tieferen Temperaturen konnten bei verschiedenen Substanzen keine guten Ergebnisse erzielt werden in Übereinstimmung mit *Al Steyermark*[3], der auch die bei *Pregl-Roth*[4] angegebene Temperatur für zu tief hält.

Der aus einem Gasometer entnommene Sauerstoff wird zur Reinigung durch ein mit Anhydrone und Caroxite gefülltes U-Rohr geleitet. Die Verwendung eines *Böck-Beaucourt*-Katalysatorröhrchens hat sich als nicht notwendig erwiesen. Die Strömungsgeschwindigkeit wird mit einem Strömungsmesser nach *Friedrich*[5] kontrolliert und beträgt 4 ml pro Minute. Auf die *Mariotte*sche Flasche wird verzichtet. Alle Bestandteile der Apparatur werden durch leicht gefettete NS-000-Schliffe verbunden.

II. Verbrennungsschema von stickstoffhaltigen Substanzen mit gealtertem Bleidioxyd.

Wir verwenden das *Merck*sche „Bleidioxyd gekörnt". Es muß einer längeren Vorbehandlung unterworfen werden. Hierzu erhitzen wir das Präparat in einem eigenen Gefäß einige Wochen auf 190° und leiten des öfteren, in Summe etwa 200 Stunden, einen staubfreien Luftstrom hindurch. Mit diesen Präparaten verbessern sich die Wasserstoffwerte deutlich.

Außerdem ist es günstig, wenn die Wasserauswaagen aufeinanderfolgender Analysen nicht zu weit auseinanderliegen und dabei leicht ansteigen (z. B. 1,2 mg, 1,3 mg, 1,35 mg, . . .). Es ist also zweckmäßig, bei der Einwaage der Substanz den ungefähren Wasserstoffgehalt zu kennen. Weiterhin ist noch zu beachten, daß das Verbrennungsrohr nach jeder Analyse, nachdem die Absorptionsgefäße abgenommen wurden, nur noch 10 Minuten lang offen bleibt und nach dieser Zeit mit einem NS-000-Schliffstöpsel verschlossen wird, damit das Bleidioxyd nicht zu

sehr austrocknet. Verbrennt man nach diesem Schema, so kann man Wasserstoffwerte erwarten, die etwa $\pm 0{,}1\%$ absolut vom theoretischen Wert entfernt liegen.

Der Austausch des verbrauchten Bleidioxyds macht bei Verwendung des Ansatzstückes keine Schwierigkeiten und ist in wenigen Minuten beendet.

III. Absorptionsgefäße mit Normalschliffanschlüssen, Verbrennungsvorschrift.

Wir verwenden stäbchenförmige, modifizierte Absorptionsapparate nach *Pregl*[4] mit einem Schliff, der für die Einfüllung des Absorptionsmittels dient und während der Arbeit mit *Krönig*schem Glaskitt festgekittet bleibt; die Kapillaren haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 0,5 mm.

Das Anschließen der Absorptionsapparate aneinander und an die Apparatur geschieht nicht mit Gummischläuchen, sondern mit NS-000-Schliffen. Durch die Verbindungsschliffe vergrößert sich das Gewicht der Absorptionsgefäße. Diese Vergrößerung wird durch die Verwendung äußerst dünner Glassorten für die Herstellung des Apparatkörpers und Verkürzung der Kapillaren auf 12 mm teilweise kompensiert, so daß das Gewicht jedes Gefäßes zwischen 5,5 und 7 g beträgt. Die Gesamtlänge eines Gefäßes beträgt zirka 200 mm. Die Gefäße werden von der Firma *P. Haack* hergestellt.

Die Absorptionsapparate werden mit Pinzetten, die eingeschnittene Kerben haben, an die Apparatur gesteckt und von dieser abgenommen. Da sie an der Apparatur durch einen übergeschobenen Glaszylinder vor Staub und Schmutz geschützt sind, und sofort nach dem Abnehmen in das Waaggehäuse gebracht und mit den Händen nicht angegriffen werden, erübrigt sich das Abwischen mit „gerade feuchtem Flanell- und Rehlederlappen" zwischen Abnehmen und Wägen und somit auch ein längeres Warten vor dem Wägen, was eine erhebliche Zeitersparnis und den Wegfall der mit dem Abwischen verbundenen Fehlerquellen bedeutet. Die Kapillaren der Absorptionsgefäße werden sofort nach dem Abnehmen von der Apparatur mit gut passenden Edelstahldrähten verschlossen.

Die Schliffe müssen unbedingt sehr gut aufeinanderpassen, da sie trocken verwendet werden. Solche Schliffe benötigen wohl eine sehr exakte Einschleifarbeit, können aber dann sehr lange Zeit hindurch verwendet werden, denn Brüche an den Schliffen sind erfahrungsgemäß sehr selten. Auch die Kapillaren brechen nur dann häufiger, wenn die Verschlußdrähte zu stramm sitzen und daher beim Einführen die Kapillaren auseinandersprengen. Die Drähte sollen so gut passen, daß sie bei senkrechter Haltung des Absorptionsröhrchens nicht herausfallen, aber doch ohne besondere Kraft verschoben werden können.

Es ist bekannt, daß Natronasbest bei der Aufnahme von Kohlendioxyd stark quillt, was zu einer frühzeitigen Verstopfung des Gefäßes führen kann, welches dann frisch gefüllt werden muß. Abgesehen vom Material- und Zeitverlust ist die letzte Analyse unbrauchbar.

Dieses Verstopfen der Luftkanäle der Natronasbestfüllung versuchte man auf verschiedene Weise zu verhindern; z. B. durch Einführung von Drähten in der Längsrichtung des Absorptionsgefäßes oder durch Beigabe von Watte zum Absorptionsmittel usw., meist ohne nachhaltigen Erfolg.

Dagegen erwies sich der Vorschlag von *O. Flunt*[2], Magnesiumperchlorat zum Natronasbest im Volumsverhältnis zirka 1 : 10 hinzuzumischen, als erfolgreich. Dadurch erzielt man eine praktisch vollständige Ausnützung der ganzen Absorptionsschicht.

Als Absorptionsmittel verwenden wir seit einiger Zeit Anhydrone und Caroxite der Firma *„Eimer and Amend"**.

Die Verbrennung erfolgt nach der Uhr mit einer Automatik[1]. Zum Vortreiben der Substanz zum großen Ofen werden 20 Minuten benötigt, für die Spülung sind 15 Minuten vorgesehen. Es wird auch mit Sauerstoff gespült; die Absorptionsgefäße werden demgemäß mit Sauerstoff gefüllt gewogen. Nach den 35 Minuten (Verbrennen und Spülen) werden die Absorptionsgefäße mit Pinzetten abgenommen, mittels der Drähte verschlossen und direkt, ohne Abwischen in die Waage gebracht. Die Wartezeit bis zur Gewichtskonstanz der Gefäße betrug bei besonders günstigen Temperaturverhältnissen (unser C'H-Raum und der Wägeraum werden von der gleichen kleinen Klimaanlage konditioniert) nur noch 5 Minuten.

IV. Ergebnisse.

Ohne Bleidioxyd ergeben sich systematisch etwas zu hohe Wasserstoffwerte. Ergebnisse von 1000 Analysen zeigen, daß man von den gefundenen Prozenten Wasserstoff abzuziehen hat: bei einem Wasserstoffgehalt bis 4% 0,15% absolut, bei einem Wasserstoffgehalt von 5 bis 10% 0,10% absolut, bei einem Wasserstoffgehalt über 10% 0,05% absolut. Der maximale Fehler von derart korrigierten Wasserstoffwerten beträgt $\pm$ 0,06% absolut.

Bei Verbrennungen *mit Bleidioxyd* beträgt der durchschnittliche Fehler aus 134 Analysen reinster Testsubstanzen beim Wasserstoff $\pm$ 0,06% absolut. Abweichungen über $\pm$ 0,15% absolut sind selten.

Die Kohlenstoffwerte zeigen bei 210 Analysen einen durchschnittlichen Fehler von 0,05% absolut; Abweichungen über $\pm$ 0,15% absolut sind selten.

* Bei Caroxite ist ein Beimischen von Magnesiumperchlorat nicht erforderlich.

Zusammenfassung.

Es wird über eine Verbrennungsapparatur für Kohlenstoff-Wasserstoffanalysen berichtet, bei der ein etwas abgeändertes Verbrennungsrohr mit zwei leicht austauschbaren Ansatzstücken verwendet wird. Um möglichst sichere Wasserstoffwerte zu erreichen, werden *stickstofffreie* Substanzen *ohne* Bleidioxyd, dagegen *stickstoffhaltige* mit *gealtertem* Bleidioxyd im Ansatzstück nach einem bestimmten Schema verbrannt.

Es werden mit Drähten verschließbare Absorptionsgefäße verwendet, die zwischen dem Abnehmen von der Apparatur und der Wägung *nicht* abgewischt werden. Ein Hinzumischen von Magnesiumperchlorat zum Natronasbest verhindert ein frühzeitiges Verstopfen des Gefäßes.

Summary.

A report is given concerning a combustion apparatus for carbon-hydrogen analyses, in which a somewhat modified combustion tube with two readily exchangeable extension tubes is used. In order to obtain hydrogen values of the highest possible reliability *nitrogen-free* materials are burned *without* lead dioxide, while *nitrogenous* samples are burned with *aged* lead dioxide in the extension tube.

Absorption vessels, which can be closed with wires are used; they are *not* wiped off between the removal from the apparatus and the weighing. An addition of magnesium perchlorate to the soda-asbestos prevents a premature clogging of the vessel.

Résumé.

On présente un appareil de combustion pour les analyses de carbone et d'hydrogène dans lequel on utilise un tube à combustion modifié, avec deux appendices facilement interchangeables. Pour obtenir aisément les meilleures valeurs possibles pour l'hydrogène, on brûle des substances non-azotées sans bioxyde de plomb, puis des substances azotées avec ce bioxyde vieilli d'après un mode opératoire précis, dans les deux appendices.

On utilise des tubes d'absorption obturables avec des fils métalliques qui, entre le moment de la séparation de l'appareil et la pesée, ne sont pas essuyés. Un mélange intime de perchlorate de magnésium à l'amiante sodé empêche une obstruction prématurée des tubes d'absorption.

Diskussion.

H. *H. Gubser* (Basel, Schweiz): Im Zusammenhang mit den Ausführungen des Vortragenden dürfte die Ausführungsweise der C-H-Bestimmung in der Schweiz interessieren. Die Füllung des Verbrennungsrohres entspricht ziemlich genau der von *Pregl* angegebenen, allerdings mit einer viel kleineren Bleidioxydschichte. Wir verwenden einen vollelektrischen Verbrennungsofen nach Dr. *Hösli*, Bischofszell, wie er in der Ausstellung gezeigt wird. Die Absorptionsröhrchen entsprechen denjenigen *Pregls*. Sie sind mit Magnesiumperchlorat bzw. Natronasbest gefüllt. Gearbeitet wird nur im Sauerstoffstrom von 7 bis 8 ml Minute. Das Wägen der Absorptionsröhrchen erfolgt nach der Stoppuhr: Auflegen des Wasser-Röhrchens nach der fünften Minute, Wägung nach der siebenten Minute, Auflegen des Kohlendioxyd-

röhrchens nach der neunten Minute, Wägung nach der elften Minute. Nach diesem Verfahren gelingt es, eine C-H-Bestimmung in 37 bis 40 Minuten durchzuführen. Die Genauigkeit entspricht den üblichen Anforderungen. Bei 10000 bis 15000 C-H-Bestimmungen allein in der Chemischen Industrie Basels ist der Zeitgewinn beträchtlich.

Gegenüber den seitens Dr. *W. Kirsten* (Uppsala) erhobenen Bedenken gegen diese Schnellmethode wird hervorgehoben, daß diese seit etwa fünfzehn Jahren an der Eidgen. Technischen Hochschule in Zürich und in der Baseler Chemischen Industrie allgemein angewendet wird. Alle organisch-chemischen Forschungen in dieser Zeitspanne sind durch dieses Verfahren der Mikro-C-H-Bestimmung belegt, wodurch deren allgemeine Anwendbarkeit erwiesen sein dürfte.

Literatur.

[1] *K. Horeischy, I. Dreher* und *O. Hoffmann-Ostenhof*, Mikrochem. **33**, 221 (1948).

[2] *O. Flunt*, Untersuchungen zur organischen Mikroanalyse, Dissertation Wien, 1948.

[3] *Al Steyermark*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **17**, 523 (1945).

[4] *F. Pregl*, Quantitative organische Mikroanalyse, 5. Aufl., neubearbeitet von Dr. *H. Roth*, Springer-Verlag Wien, 1947.

[5] *A. Friedrich*, Die Praxis der quantitativen organischen Mikroanalyse, Franz Deuticke, Leipzig und Wien, 1933.

Aus dem Mikrolaboratorium des I. Chemischen Laboratoriums der Universität Wien.

Volumetrische Mikrobestimmung von Chlor, Brom und Schwefel in organischen Substanzen nach der Spiralrohrmethode.

Von

Herbert Wagner und **Fritz Bühler***.

(Eingelangt am 22. Juni 1950.)

Die bekannte Methode von *F. Pregl*[1] hat so viele Vorzüge, daß wir versucht haben, sie durch Abänderung und Modernisierung weiter zu entwickeln; insbesondere bestimmen wir die Ionen volumetrisch.

I. Apparatur.

Nach *Pregl* bestehen Verbrennungs- und Absorptionsrohr aus einem Stück. Wir haben es als sehr vorteilhaft gefunden, beide Teile zu trennen, und zwar so, daß an das Ende des Verbrennungsrohres ein NS-000-Kernschliff angesetzt wird, an den das Absorptionsrohr angeschlossen wird. Man vermeidet so das Abschalten des großen Verbrennungsofens nach Beendigung jeder einzelnen Verbrennung, das jedesmalige Auskühlenlassen, Herausnehmen des Platinkontaktes, Ausspülen und Trocknen des Verbrennungsrohres. Demnach kann das Verbrennungsrohr dauernd im Verbrennungsofen bleiben. Lediglich das Absorptionsrohr wird nach jeder Verbrennung abgenommen und ausgespült. Es kann nach abermaliger Benetzung mit Absorptionsflüssigkeit unmittelbar aufs neue verwendet werden. Bei Serienverbrennungen wird der große Ofen dauernd eingeschaltet gelassen.

Das *Verbrennungsrohr* besteht aus Quarzglas, die Sauerstoffzufuhr erfolgt von der Seite.

Als *Kontakt* werden 600 mg Quarzwolle verwendet, die man weder vorbehandelt, noch besonders trocknet oder zusammendrückt; sie wird

* Derzeit U. S. A. „Benjamin Franklin", Franklin Blvd., Long Beach, L. I., N. Y.

in einer Länge von 200 mm an die Stelle des Verbrennungsrohres gebracht, über der sich der große Verbrennungsofen befindet.

Wir haben die benützten *elektrischen Öfen* selbst hergestellt.

Der von uns verwendete kleine bewegliche Ofen ist 70 mm lang und hat eine Leistung von 173 Watt. Die aus Cekas-Extradraht bestehende Heizwicklung wird an den Enden mit einem Nickelseil verschweißt. Der Heizdraht wird auf eine Quarzhülse aufgewickelt[2] und am Ende mit Metallschellen auf ihr festgeklemmt. Der große Ofen ist 260 mm lang und hat eine Leistung von 250 Watt. Die Isolierung gegen Wärmeabstrahlung kann mit Kieselgurpulver oder Asbestfasern vorgenommen werden, die zwischen Quarzhülse und äußerem Glasrohrmantel eingebracht werden. Ein und derselbe Ofen erreicht mit einer Isolierung von Kieselgurpulver 950 °, mit Asbestfasern 820° und ohne Isolierung ungefähr 650°.

Das letzte Stück des großen Ofens wird nicht isoliert, um einen Wärmeabfall zu erzielen; doch muß bei der Verbrennung schwefel- bzw. jodhaltiger Substanzen die Temperatur in Höhe der Schliffverbindung oberhalb 400° sein, so daß weder Schwefelsäure noch Jod vor dem Erreichen des Absorptionsrohres kondensieren können.

Zur Messung der *Strömungsgeschwindigkeit* dient ein geeichter Strömungsmesser nach *A. Friedrich*[3]. Sie darf 4 bis 8 ml pro Minute betragen, nur bei Einwaagen über 8 mg darf sie 5 ml pro Minute nicht überschreiten.

Unser *Absorptionsrohr* hat die bekannte Form, aber ein *kleineres* Volumen als das *Pregl*sche Modell.

Bei einer Länge von 310 mm hat es einen äußeren Durchmesser von 9 mm (bei *Pregl* 11 mm). Während das *Pregl*sche Spiralrohr auf 190 mm 35 Windungen besitzt, entsprechen bei unserem Spiralrohr einer Länge von 190 mm nicht weniger als 50 Windungen. Infolgedessen und auch wegen seines geringeren Durchmessers erfordert unser Spiralrohr eine wesentlich geringere Menge Spülflüssigkeit. Die Spirale muß so eng als möglich sowohl an der Außenwand als auch an dem Glasstab anliegen, um den sie gewickelt ist. Bei senkrecht gehaltenem Absorptionsrohr muß eine am oberen Rand eingespritzte geringe Menge Flüssigkeit die ganze Spirale in einem Zuge durchlaufen, ohne unbenetzte Stellen zurückzulassen.

Das Ende des Spiralrohres, das die Verbindung zum Verbrennungsrohr herstellt, wird von einer NS-000-Schliffhülse gebildet, die ohne Fettung auf den Kernschliff des Verbrennungsrohres paßt. Man wäscht das senkrecht eingespannte Spiralrohr von demjenigen Ende aus durch, das dem Verbrennungsrohr abgewendet war, also im Gegenstrom. Das Volumen der Waschflüssigkeit darf im Interesse eines scharfen Umschlages bei der anschließenden argentometrischen Titration nicht mehr als 8 ml betragen, so daß unser *enges* Spiralrohr für die volumetrische Bestimmung nicht entbehrt werden kann.

Als *Absorptionsmittel* dient eine Mischung von 3 ml Perhydrol mit 7 ml Wasser. Nach dem Durchspülen des Absorptionsgefäßes mit

destilliertem Wasser braucht dieses nicht getrocknet zu werden, da die Absorptionsfähigkeit des erwähnten Gemisches durchaus nicht eng an die angegebene Konzentration gebunden ist.

II. Halogenbestimmung.

Als *Adsorptionsindikator* hat sich Dichlorfluorescein am besten bewährt. Die Indikatorlösung wird nach der Vorschrift von *I. M. Kolthoff, W. M. Lauer* und *C. I. Sunde*[4] bereitet, indem 0,1 g Indikator in 60 ml Alkohol gelöst, mit 2,5 ml 0,1-n Natronlauge versetzt und auf 100 ml aufgefüllt werden. Für jede Titration werden 3 Mikrotropfen dieser Indikatorlösung angewendet.

O. E. Sundberg und *G. L. Royer*[5] titrieren in mit Natriumacetat abgepufferter Lösung, der das gleiche Volumen an Aceton zugesetzt worden ist. Es gelang uns bei dieser Vorgangsweise nicht immer, den Endpunkt durch Farbumschlag klar zu erkennen, da Koagulation manchesmal schon vor dem Endpunkt, meist jedoch im Endpunkt, manchmal auch nachher auftrat. Daher war es uns auch nicht möglich, mit Hilfe der Koagulation des Niederschlages einen leicht erkennbaren Endpunkt der Titration festzulegen. Außerdem war bei dem angegebenen Titrationsvolumen (20 bis 30 ml) der Umschlagspunkt nicht scharf genug. Deshalb setzten wir das Volumen so weit wie möglich herab und titrieren statt, wie dort angegeben, in einem *Erlenmeyer*-Kolben in einer weißen Porzellankasserolle.

Die nähere Untersuchung der Verhältnisse ergab folgendes:

Bei Einstellung des Titers der 0,01-n Silbernitratlösung mit Einwaagen von festem Kaliumchlorid *ohne Acetonzusatz* wurden gut übereinstimmende Werte gefunden.

Bei Verwendung von Dextrin als Koagulationsschutz machte sich ein zu starkes Streuen der Werte bemerkbar.

Zusatz von Aceton verschiebt den Endpunkt nicht, macht jedoch den Umschlag deutlicher. Ähnlich, doch weniger intensiv wie Aceton, wirkt auch Äthylalkohol.

Bei Einstellung des Titers der Silbernitratlösung mit Einwaagen von festem Kaliumbromid erfolgt der Umschlag später als mit Kaliumchlorid, so daß sich ein etwas niedrigerer Titer ergibt; doch bewirkt auch hier die Zugabe von Aceton bzw. Alkohol keine Änderung des Titers. Hier kann wegen der größeren Intensität des Umschlages auf die Zugabe von Alkohol oder Aceton verzichtet werden.

Während in schwach saurem Medium schon bei der Titration der Niederschlag meistens koaguliert, ist dies in neutralem oder alkalischem Medium erst längere Zeit nach Beendigung der Titration der Fall. Da bei der Verbrennung einer Substanz, die außer Halogen auch Stickstoff und Schwefel enthält, die Acidität noch größer ausfällt, ist es daher am

zweckmäßigsten, die Absorptionslösung vor der Titration mit Silbernitrat mit 0,1-n Kalilauge zu neutralisieren, wobei als Indikator Bromthymolblau verwendet wird. Der hellblaue Farbton dieses Indikators stört die anschließende Titration mit Dichlorfluorescein nicht.

Auf Grund aller Vorversuche hat sich folgende *Arbeitsweise* als zweckmäßig erwiesen:

Die ungefähre Kenntnis des Chlor- oder Bromgehaltes ist vorteilhaft, da man zweckmäßig soviel Substanz für die Verbrennung einwägt, daß bei der Titration der Verbrauch an 0,01 n Silbernitratlösung 3 bis 6 ml beträgt.

In diesem Bereich kann nämlich der Umschlagspunkt bis auf einen halben Tropfen genau ermittelt werden. Ist es nicht möglich, eine entsprechend große Einwaage zu verwenden, so setzt man vor der Titration eine bekannte Menge Kaliumchlorid oder Kaliumbromid zu, damit der Verbrauch an Silbernitrat diesen Betrag erreicht (der Zusatz erfolgt als feste Einwaage, um das Lösungsvolumen nicht zu vermehren). Oder man dampft die Titrationslösung nach der Neutralisation über offener Bunsenflamme in einer Porzellankasserolle bis auf 1 ml ein, läßt dann auskühlen, fügt 0,5 bis 1 ml Aceton zu und titriert anschließend.

Das Spiralrohr wird mit der Wasserstoffperoxydlösung benetzt; die Schliffhülse wird vor dem Aufbringen auf das Verbrennungsrohr getrocknet. Die in ein Platinschiffchen eingewogene Substanz wird in das Verbrennungsrohr etwa 40 mm vor dem großen Ofen eingebracht und die Strömungsgeschwindigkeit des Sauerstoffstromes eingestellt bzw. kontrolliert. Die Substanz wird mit dem kleinen Ofen, der vermittels eines Synchronmotors[2] vorwärtsbewegt wird, innerhalb von 15 Minuten verbrannt und anschließend noch 7 Minuten lang die Apparatur mit Sauerstoff durchspült.

Das Spiralrohr wird sodann abgenommen und nach dem *Auskühlenlassen* der Schliffhülse senkrecht über einer weißen Porzellankasserolle (Durchmesser 60 mm) so eingespannt, daß das dem Verbrennungsrohr abgewandt gewesene Ende oben ist. Dann wird mit 2 ml Wasser, anschließend mit 2 ml Aceton und dann nochmals mit 2 ml Wasser durchgespült und die untere Schliffhülse mit Wasser abgespritzt. Nach Zusatz von 1 Tropfen Bromthymolblaulösung wird mit 0,1-n Kalilauge bis zum Auftreten eines hellblauen Farbtones neutralisiert. Die blau gefärbte Lösung wird mit 0,01-n Schwefelsäure zurücktitriert, und zwar bis auf eben einen Tropfen vor Verschwinden der Blaufärbung. Hierauf wird das Titrationsgefäß mit der Lösung neuerlich unter das senkrecht eingespannte Absorptionsrohr gebracht und dieses abermals mit einer geringen Menge destillierten Wassers (etwa 0,25 ml) nachgespült. Die Lösung soll dabei blau bleiben; dies ist eine zweckmäßige Überprüfung, ob quantitativ ausgespült wurde.

Die Titration wird in einem verdunkelten Raum vorgenommen, als Beleuchtung dient eine Tageslichtlampe. Nach Zufügen von 3 Tropfen Dichlorfluoresceinlösung wird mit 0,01-n Silbernitratlösung bis zum Farbumschlag nach orangebraun titriert. Falls etwas übertitriert worden ist, kann man, da im neutralen Medium die Koagulation nicht so rasch eintritt, mit einer 0,01-n Natriumchloridlösung wieder zurücktitrieren. Dies ist vor allem bei einem unklaren Umschlagspunkt von Vorteil, da es dann durch ein- oder mehrmaliges Hin- und Zurücktitrieren möglich ist, den richtigen Endpunkt „einzugabeln".

III. Testverbrennungen.

Bei der Verbrennung am Platinkontakt ergab sich, daß die Temperatur des großen Ofens über 720° betragen muß. Andernfalls werden die Analysenwerte bei vielen Substanzen zu niedrig. Zweckmäßig ist eine Temperatur von 800°, doch muß das Verbrennungsrohr aus Quarz bestehen, da ein Supremaxrohr schon bei 750° Deformationen zeigt.

Auch mit Quarzwolle als Kontaktsubstanzen lieferten unter 700° ausgeführte Verbrennungen durchwegs zu niedere Werte.

Als Beleg für die Leistungsfähigkeit der Methode seien einige Ergebnisse angeführt:

Substanz	Halogen berechnet %	Halogen gefunden %
Chlorbenzoesäure	22,64 Cl	22,68
p-Chlornitrobenzol	22,50 Cl	22,47
Chloralurethan	44,95 Cl	44,85
Bromnitrobenzol	39,56 Br	39,64
Dibromoxychinolin	52,77 Br	52,70

Die in der Tabelle angeführten Werte stellen Mittelwerte aus je 15 Analysen dar.

Der durchschnittliche Fehler aus 100 Analysen (Verbrennung mit Quarzwolle als Kontakt) beträgt 0,08% absolut. Abweichungen über $\pm$ 0,15% absolut sind sehr selten.

Der Vollständigkeit halber wurde auch eine Anzahl von Verbrennungen im Luftstrom bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 12 ml pro Minute ausgeführt, die ebenfalls gute Werte lieferten.

IV. Besondere Erfahrungen und Vorschriften.

a) Mikrobestimmung von Schwefel in organischen stickstoffreien Substanzen.

Organische *schwefelhaltige Substanzen ohne Stickstoff* werden in derselben Weise und in der gleichen Apparatur verbrannt, nur ist unbedingt

darauf zu achten, daß in Höhe der Schliffverbindung Verbrennungsrohr—Spiralrohr eine Temperatur von 400° herrscht. Die Verbrennungsprodukte werden in *neutraler* Wasserstoffperoxydlösung absorbiert und anschließend mit 0,01-n Kalilauge und einem Mischindikator aus Methylrot und Methylenblau nach *L. W. Winkler*[6] acidimetrisch titriert.

Der durchschnittliche Fehler aus 100 Analysen reinster Testsubstanzen beträgt 0,10% absolut. Abweichungen über ± 0,15% absolut sind selten.

b) Mikrobestimmung Chlor (bzw. Brom) und Schwefel enthaltender organischer Substanzen.

Substanzen, die gleichzeitig Chlor (Brom) und Schwefel enthalten, werden, wie zuvor beschrieben, verbrannt, jedoch die Absorptionslösung *nur mit destilliertem Wasser* aus dem Absorptionsrohr gespült. Als Absorptionsflüssigkeit muß auch hier, wie bei der Schwefelbestimmung, neutrales Wasserstoffperoxyd verwendet werden. Nach Zugabe eines Tropfens Mischindikator wird mit 0,01-n Kalilauge, wie bei der Schwefelbestimmung, titriert und die Menge Kalilauge für die Neutralisation der Summe Chlor- (Brom-) Wasserstoffsäure + Schwefelsäure festgestellt. Nun wird über offener Bunsenflamme die Lösung auf ein Volumen von etwa 2 bis 4 ml eingedampft, nach dem Abkühlen mit 2 ml Aceton versetzt und das Halogenion nach Zufügen von drei Mikrotropfen Dichlorfluorescein mit 0,01-n Silbernitratlösung titriert. Nach Berücksichtigung des Titers wird der Verbrauch an Silbernitrat von dem der Kalilauge abgezogen und so die Prozente Schwefel und Chlor (Brom) errechnet.

c) Bestimmung chlorhaltiger organischer Verbindungen mit einem Chlorgehalt unter 3%.

Wir hatten die Aufgabe, organische hochpolymere Substanzen, enthaltend C, H, O, Cl, mit einem *sehr* geringen Prozentgehalt an Chlor zu analysieren[7, 8, 9]. In diesem Falle müßte man sehr große Einwaagen nehmen, um bei der argentometrischen Titration einen Verbrauch von einigen Millilitern zu erhalten. Da es aber schwierig war, Einwaagen von 20 mg und mehr in verhältnismäßig kurzer Zeit zu verbrennen, ohne daß sich unverbrannte Kohle im Absorptionsrohr absetzte, und überdies so große Substanzmengen gar nicht verfügbar waren, wurden nur 10 bis 17 mg dieser Substanzen verbrannt und anschließend acidimetrisch titriert. Natürlich durften solche Substanzen keinen Stickstoff enthalten.

Die Ergebnisse waren ebenso befriedigend, wie bei der Bestimmung schwefelhaltiger Substanzen.

d) Bestimmung des Jods.

Für die Bestimmung des Jods wurde genau nach *Th. Leipert*[10] vorgegangen. Natürlich muß man auch hier darauf achten, daß die

Temperatur über der Schliffverbindung Verbrennungsrohr—Spiralrohr hoch genug ist, so daß alles Jod in das Spiralrohr hineindestilliert.

Die Quarzwolle bewährte sich auch in diesem Falle als Kontakt.

Wir konnten mit Herrn Prof. *F. Hecht* über mehrere im Laufe der Arbeit aufgetretene Fragen diskutieren und danken für wertvolle Hinweise, auch bei der Abfassung dieser Arbeit.

Zusammenfassung.

Organische halogen- und schwefelhaltige Substanzen werden in einem mit Quarzwolle gefüllten Quarzrohr verbrannt und die Verbrennungsprodukte in einem abnehmbaren Spiralrohr absorbiert. Das Halogenion wird anschließend argentometrisch und die Schwefelsäure acidimetrisch titriert.

Summary.

Organic materials containing halogen and sulfur are burned in a quartz tube filled with quartz wool and the combustion products are absorbed in a detachable spiral tube. The halogen ion is subsequently titrated argentometrically and the sulfuric acid alkalimetrically.

Résumé.

Les substances organiques contenant des halogènes et du soufre sont brûlées dans un tube de quartz rempli de laine de quartz et les produits de la combustion sont absorbés dans un tube amovible, en spirale. L'ion halogène est finalement titré par argentométrie et l'acide sulfurique, acidimétriquement.

Literatur.

[1] *F. Pregl*, Quantitative organische Mikroanalyse, 5. Aufl., neubearbeitet von Dr. *H. Roth*, Springer-Verlag Wien, 1947.

[2] *K. Horeischy*, *I. Dreher* und *O. Hoffmann-Ostenhof*, Mikrochem. **33**, 221 (1948).

[3] *A. Friedrich*, Die Praxis der quantitativen organischen Mikroanalyse, Franz Deuticke, Leipzig und Wien, 1933.

[4] *I. M. Kolthoff*, *W. M. Lauer* und *C. I. Sunde*, J. Amer. Chem. Soc. **51**, 3273 (1929).

[5] *O. E. Sundberg* und *G. L. Royer*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **18**, 719 (1946).

[6] *L. W. Winkler*, Chem. techn. Untersuchungsmethoden, Ergänzungswerk zur 8. Aufl., Bd. I, 1939, S. 325.

[7] *J. W. Breitenbach* und *W. Schulz*, Monatsh. Chem. **80**, 463 (1949).

[8] *J. W. Breitenbach*, Monatsh. Chem. **80**, 737 (1949).

[9] *J. W. Breitenbach*, *A. Schindler* und *Ch. Pflug*, Monatsh. Chem. **81**, 21 (1950).

[10] *Th. Leipert*, Mikrochem., Pregl-Festschrift 266 (1929).

Aus dem Mikrolaboratorium des I. Chemischen Laboratoriums der Universität Wien.

Über die volumetrische Mikrobestimmung von Schwefel in stickstoffhaltigen organischen Substanzen.

Von

Wolfgang Padowetz.

(Eingelangt am 22. Juni 1950.)

Die in der vorhergehenden Arbeit beschriebene modifizierte *Pregl*sche Verbrennungsapparatur sollte auch für die Schwefelbestimmung in stickstoffhaltigen Substanzen Verwendung finden. Die bisher angewandte gravimetrische Methode[1] befriedigte infolge ihrer Fehlerquellen nicht.

I. Grundlagen.

Wir haben auf ein von *G. Ingram*[2] angegebenes Prinzip der Schwefelsäurebestimmung zurückgegriffen. Er benützt die von *D. T. Gibson*, *T. H. Caulfield*[3] und *E. J. Vaughan*[4] beschriebene Reaktion von Mercurioxycyanid für die Mikroanalyse von Chlor, Alkoxyl und Schwefel. Werden lösliche Chloride mit diesem Reagens umgesetzt, dann werden nach der Gleichung:

$$BaCl_2 + 2\ Hg(OH)CN = Ba(OH)_2 + 2\ Hg(CN)Cl \qquad (I)$$

freie Hydroxylionen gebildet.

Speziell zur Schwefelbestimmung hat *G. Ingram*[2] die durch Oxydation entstandene Schwefelsäure mit einer gemessenen Menge gestellter Bariumchloridlösung im Überschuß gefällt und eingedampft. Dabei entweicht die bei der Umsetzung:

$$x\ H_2SO_4 + n\ BaCl_2 = x\ BaSO_4 + (n - x)\ BaCl_2 + 2\ x\ HCl \qquad (II)$$

gebildete freie Salzsäure. Nach deren quantitativen Entfernung entspricht der Chlorionengehalt des zurückgebliebenen Salzgemisches dem Bariumchlorid*überschuß*. Diesen bestimmt *G. Ingram* nach Gl. (I) durch Umsetzung mit Mercurioxycyanid und Titration der gebildeten Hydroxylionen.

Wir ziehen vor, den Bariumchlorid*überschuß* in Form der Chlorionen durch direkte argentometrische Titration mit Dichlorfluorescein als Indikator zu bestimmen und erzielen damit auch den Vorteil, die gut haltbare und einfach zu kontrollierende 0,01-n Silbernitratlösung als Maßlösung verwenden zu können.

II. Die Bestimmung.

Die Verbrennung erfolgt in derselben Apparatur, die in der vorhergehenden Arbeit[5] beschrieben wurde. Als Absorptionsmittel wird wieder eine etwa 3%ige Wasserstoffperoxydlösung verwendet. Wichtig ist hier jedoch die *Reinheit* des Perhydrols. Das Handelsprodukt enthält oft Schwefelsäure oder andere Zusätze, die die Bestimmung stören; unreine Produkte sind nach Neutralisation mit Bariumoxyd einer Vakuumdestillation zu unterwerfen; die aus einem 30%igen Produkt bei 50 Torr übergehende Hauptmenge kann, entsprechend mit Wasser verdünnt, als Absorptionslösung verwendet werden.

Nach Beendigung der Verbrennung wird die Absorptionslösung mit dreimal 2 ml Wasser aus dem Spiralrohr in eine Porzellankasserolle (60 mm Durchmesser) gespült. Da nach zahlreichen Versuchen das Vertreiben der Salpetersäure *vor der Fällung mit Bariumchlorid* durch Abdampfen auf dem siedenden Wasserbad nur dann richtige Resultate ergibt, wenn das Eindampfen im richtigen Moment unterbrochen wird, wurde diese Methode fallen gelassen. Es wird daher die Absorptionslösung in der Kasserolle nur kurz bis zum Sieden erhitzt und dann sofort tropfenweise mit 2 ml einer gestellten 0,05-n Bariumchloridlösung gefällt. Zur genauen Messung des Volumens dient eine *Pregl*sche Auswaschpipette. Da der Umschlagspunkt bei der argentometrischen Titration am besten zu erkennen ist, wenn zirka 4 bis 6 ml 0,01-n Silbernitratlösung verbraucht werden, soll ein Bariumchloridüberschuß von etwa 6 mg vorliegen. Aus diesem Grunde wird 0,05-n Bariumchloridlösung verwendet und die Einwaage so bemessen, daß sie 0,7 bis 0,9 mg Schwefel enthält.

Nach der Fällung mit Bariumchlorid wird eingedampft und das Salzgemisch zunächst mit 1 ml Wasser aufgenommen, um das in Salzsäure schwer lösliche Bariumchlorid in Lösung zu bringen; sodann wird noch mit 1 ml 2-n Salzsäure versetzt und auf dem Wasserbad abgeraucht. Diese Operation wird noch dreimal wiederholt.

Das Abrauchen mit Salzsäure muß durchgeführt werden, da sonst die Ergebnisse *zu hoch* ausfallen. Dies kann folgende Gründe haben:

a) Bei der Fällung von Schwefelsäure in Gegenwart von Salpetersäure wird Bariumnitrat mitgerissen[6].

b) Beim Eindampfen nach der Fällung verdrängt die Salpetersäure die Chlorwasserstoffsäure teilweise aus ihrem Salz.

In beiden Fällen wird der titrierbare Chloridgehalt des nach dem Eindampfen zurückgebliebenen Salzgemisches nicht dem theoretischen Bariumionen*überschuß* entsprechen. Er wird kleiner sein und erklärt dadurch die anfangs zu hohen Werte.

Anschließend wird die Salzsäure quantitativ vertrieben. Wie Versuche ergaben, wird dies erreicht, wenn man nach dem Abrauchen den Rückstand zweimal mit je 2 ml Wasser aufnimmt und neuerlich eindampft. Infolge der kleinen Volumina erfordert der gesamte Vorgang nur wenig Zeit.

Nun wird mit zirka 3 ml Wasser aufgenommen und zum Auflösen des Bariumchlorids aufgekocht.

In Bariumchloridlösungen bewirken die Bariumionen bei der argentometrischen Titration eine vorzeitige Koagulation[7], so daß besonders bei langsamer Titration der Endpunkt schwer zu erkennen ist. Um diese störende Wirkung der Bariumionen auszuschalten, werden sie mit Kaliumsulfat ausgefällt. Eine Filtration erübrigt sich, da das gebildete Bariumsulfat weiter nicht stört.

Die Fällung erfolgt so, daß man zu der zum Sieden erhitzten Lösung tropfenweise Kaliumsulfatlösung zufügt. Ein geringer Überschuß an Fällungsmittel ist ohne Belang*. Diese Fällung bewirkt keinen Fehler, da Bariumchlorid nicht in praktisch bemerkbaren Mengen mitgerissen wird, erleichtert aber die Erkennung des Endpunktes bedeutend.

Anschließend wird die argentometrische Titration ausgeführt, wie in der vorhergehenden Arbeit beschrieben.

Eindampfen und Abrauchen nehmen ungefähr die gleiche Zeit in Anspruch wie eine Verbrennung. Werden zwei Kasserollen verwendet, kann ohne Stockung durchlaufend analysiert werden.

III. Testanalysen.

Als Beleg für die Leistungsfähigkeit der Methode seien einige Ergebnisse angeführt:

Tabelle 1.

Substanz	S berechnet %	S gefunden %
Sulfonal	28,08	28,06
Trional	26,46	26,43
Allylthioharnstoff	27,58	27,65
Sulfanilsäure	18,50	18,49
p-Toluolsulfosäureamid	18,74	18,72

* Zweckmäßig verwendet man 1 ml einer Lösung von 6 g Kaliumsulfat pro Liter.

Die in der Tabelle angeführten Werte stellen Mittelwerte aus je 10 Analysen dar.

Der durchschnittliche Fehler aus 50 Analysen beträgt 0,11% absolut. Abweichungen über $\pm$ 0,2% absolut sind äußerst selten.

Herrn Prof. *L. Ebert* und Herrn Dr. *H. Wagner* möchte ich an dieser Stelle für wertvolle Unterstützung danken.

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode beschrieben, die es gestattet, Schwefel in organischen Substanzen neben Stickstoff volumetrisch zu bestimmen. Die durch Verbrennung gebildete Schwefelsäure wird mit überschüssigem Bariumchlorid ausgefällt. Nach dem Vertreiben der bei der Umsetzung gebildeten freien Salzsäure wird der Bariumchloridüberschuß durch argentometrische Titration der Chlorionen bestimmt. Durch die Anwesenheit von Salpetersäure bedingte Störungen werden durch Abrauchen mit Salzsäure beseitigt.

Summary.

A method is described by which sulfur can be determined volumetrically in organic materials which also contain nitrogen. The sulfuric acid produced by combustion is precipitated by adding a measured excess of barium chloride. After driving off the free hydrochloric acid formed in the reaction, the excess of barium chloride is determined by argentometric titration of the chloride ions. The interference due to the presence of nitric acid is obviated by fuming with hydrochloric acid.

Résumé.

On décrit une méthode permettant de doser volumétriquement le soufre dans les matières organiques en présence d'azote. L'acide sulfurique formé dans la combustion est précipité par un excès de chlorure de baryum. Après élimination de l'acide chlorhydrique libre formé, le chlorure de baryum en excès est titré argentométriquement. En présence d'acide azotique, les interférences produites sont éliminées par évaporation à fumée avec l'acide chlorhydrique.

Diskussion.

H. *P. Gouverneur* (Amsterdam, Holland) bemerkt, daß bei Anwendung der Arbeitsweise von *Ogg* (USA.) gleich gute Resultate für Schwefel (bei Anwesenheit von Stickstoff oder Halogenen) erhalten werden. Die Schwefelsäure wird hierbei direkt mit 0,01-n-Bariumchlorid unter Verwendung von Tetraoxychinon als Indikator titriert. Ein entsprechendes Farbfilter erleichtert die Beobachtung des Umschlages.

H. *H. Wagner* (Wien, Österreich): Ich kenne die Arbeit von *Ogg*, hatte aber noch keine Gelegenheit, mit Tetraoxychinon zu arbeiten. Ich konnte jedoch feststellen, daß der Titer von Bariumchlorid-Lösungen — wie bereits mehrfach in der Literatur erwähnt — nicht konstant bleibt.

Literatur.

[1] *F. Pregl*, Quantitative organische Mikroanalyse, 5. Aufl., neubearbeitet von Dr. *H. Roth*, Springer-Verlag Wien, 1947.

[2] *G. Ingram*, Analyst **69**, 265 (1944); durch Chem. Zbl. **1945 I**, 1509.

[3] *D. T. Gibson* und *T. H. Caulfield*, Mikrochem. **17**, 262 (1935); vgl. auch *D. W. Cowie* und *D. T. Gibson*, Analyst **59**, 388 (1934).

[4] *E. J. Vaughan*, Nature **152**, 555 (1943); durch Chem. Zbl. **1945 I**, 1150.

[5] *H. Wagner* und *F. Bühler*, Mikrochem. **36/37**, 641 (1951).

[6] *F. P. Treadwell*, Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie, 19. Aufl., Bd. II, Wien und Leipzig, S. 397.

[7] *I. M. Kolthoff*, Die Maßanalyse, 2. Teil, Berlin, 1927, S. 206.

Laboratoire de Micro-analyse, Société des Usines Chimiques Rhône-Poulenc, Vitry-sur-Seine.

Quelques perfectionnements proposés pour le dosage sélectif rapide par voie chimique des halogènes organiques (ou minéraux)

Par

F. Martin.

(Reçu le 18 juillet 1950.)

L'analyste, à qui on demande le dosage de *tel* ou *tel* halogène, dans un produit dont il ignore bien souvent la constitution et le mode d'obtention, doit avoir en main une ou des méthodes donnant à *coup sûr*:

a) Une minéralisation totale et sans perte.

b) Un dosage sélectif et rapide de l'halogène en question (même en la présence, voulue ou non, d'un autre halogène).

A. Minéralisation.

En ce qui concerne la *minéralisation*, on peut dire qu'en ce moment, deux méthodes seulement semblent avoir un caractère assez général pour les besoins de la Micro ou de la Semi-microanalyse.

a) La combustion dans l'oxygène, selon *Pregl*, avec ses nombreuses variantes apportées par divers expérimentateurs.

b) La fusion dans la microbombe, avec un mélange de Na_2O_2, NO_3K et sucre; technique aujourd'hui très répandue et décrite, avec quelques variantes aussi, dans les ouvrages de Microanalyse.

Pour le travail en série, cette dernière se révèle, à l'expérience, très avantageuse, parce que *plus rapide* et plus sûre, dans certains cas, que la combustion selon *Pregl* (Produits volatiles: Chlorobutane par exemple, ou difficiles à bruler: Tétrachlorure de Carbone).

Elle permet d'ailleurs la minéralisation dans le but de doser d'autres éléments que les Halogènes, tels que le Soufre, le Phosphore, l'Arsenic.

Pour être juste, il faut ajouter cependant qu'elle se prête surtout aux dosages semi-microanalytiques et que son avenir est assuré dans les opérations de «contrôle» des produits chimiques.

B. Dosage sélectif des Halogènes.

Quoi qu'il en soit, le but de ce travail, qui n'a pas la prétention d'apporter des méthodes *nouvelles* dans leur principe, a été de rechercher celles qui sont susceptibles de permettre le dosage chimique *simple*, *direct* et *sélectif* de tel ou tel halogène, après minéralisation à la bombe.

Principe des dosages.

Nous nous sommes proposés de résoudre ce problème sur les bases suivantes:

a) *Dosage du Chlore:*

Le résidu de fusion à la bombe, repris par de l'eau chaude (30 à 40 ml en tout) et mis à bouillir pour détruire l'eau oxygénée, est neutralisé par de l'acide nitrique. Un excès de NO_3H est ajouté de façon à avoir finalement une liqueur à 25% (poids/volume) de NO_3H. La solution est soumise à une courte ébullition et on fait passer un courant de gaz inerte (air ou azote) pendant un temps déterminé. L'Iode et le Brôme sont éliminés; il reste Cl.

Le dosage de Cl se fait ensuite par gravimétrie ou plus rapidement par volumétrie.

b) *Dosage du Brôme:*

Le dosage du Brôme est basée sur sa transformation en Bromate décrite par plusieurs auteurs, par une solution d'Hypochlorite de Sodium ou tout simplement de l'eau de Javelle concentrée (à 28° chlorométriques). L'excès d'Hypochlorite est détruit soit par le formiate de Sodium, soit par ébullition à p_H déterminé avec passage de gaz inerte. Le Bromate est titré ensuite en présence d'Iodure, en solution sulfurique.

La méthode ne permet pas le dosage du Brôme en présence d'Iode; l'Iode est aussi oxydé à l'état d'iodate.

Nous ne connaissons pas de *méthode chimique simple*, pour doser *directement le* Brôme en présence d'Iode.

c) *Dosage de l'Iode:*

L'Iode est oxydé, dans la solution neutralisée, par de l'eau de Brôme; l'excès de Brôme est éliminé par *ébullition*. L'Iodate formé est dosé volumétriquement. La technique est aujourd'hui bien connue.

Le Chlore et le Brôme présents ne gênent pas.

Discussion.

Nous ne pouvons pas ici faire la critique des modes opératoires précis déjà décrits dans la littérature, ni exposer en détail le résultat de nos propres expériences.

Ce qui est certain, c'est que dans l'application de ces techniques, on se heurte à de *nombreuses difficultés* et nous ne considérons pas le problème comme résolu définitivement. Nous ne donnerons donc que l'essentiel de nos observations.

A. Dosage du Chlore.

La technique proposée est décrite dans certains ouvrages pour la recherche de traces de chlore dans les Bromures.

a) Dans « Analar Standards for Laboratory Chemicals» de British Drug Houses Ltd. et Hopkins et Williams Ltd. à l'article « Potassium Bromide» page 186.

b) Dans la « British Pharmacopoeia 1948», pour le même produit, page 426.

Transposée sur le plan semi-microanalytique et pour des mélanges en proportions variables de Chlorure et de Bromure la méthode donne des résultats *acceptables* dans les conditions suivantes:

Prise d'essai: 100 mg KCl + KBr
Volume total: 40 ml
Teneur en NO_3H: 25%.

(La prise d'essai est dissoute dans 30 ml d'eau et on ajoute 10 ml d'Acide nitrique de densité 1,42, à 70% de NO_3H.)

Temps d'ébullition: 1 minute avec barbotage d'air puis 20 minutes de passage d'air sans ébullition.

Résultats.

Tableau 1.

mg KCl + KBr	Cl introduit	Cl trouvé	Erreur %
0—100	traces	traces	0
10—90	4,8	4,8	0
		4,8	0
20—80	9,4	9,2	— 2,0%
		9,1	— 3,0%
50—50	24,0	23,7	— 1,2%
		23,5	— 2,0%
80—20	38,1	38,0	— 0,3%
		38,1	0
100—0	48,0	47,8	— 0,6%
		47,8	— 0,6%

Par contre, si on ajoute dans l'essai 3 à 4 g de Nitrate de Sodium, ce qui représente à peu près le poids de sels obtenu après neutralisation du contenu de la microbombe, les résultats sont moins bons: le dosage du Chlore est déficitaire:

Tableau 2.

mg KCl + KBr	Cl introduit	Cl trouvé	Erreur %
0—100	traces	traces	0
10—90	4,8	4,5	— 6%
20—80	9,4	8,9	— 5%
50—50	24,0	23,1	— 3,6%
80—20	38,1	34,2	— 10,0%
100—0	48,1	46,7	— 2,4%

Mais il est peut être possible, en multipliant les essais, de fixer des conditions permettant d'obtenir des résultats plus sûrs. La méthode est tellement simple qu'elle mériterait d'être étudiée plus à fond.

B. Dosage du Brôme.

Nous nous sommes inspirés de la technique décrit par *Alicino, Crickenberger* et *Reynolds*[1]

Bien que l'auteur précise que la technique est applicable après fusion à la bombe, les résultats n'ont pas été satisfaisants.

Après de *trés nombreux essais*, nous nous sommes arrêtés au mode opératoire ci-après:

Prise d'essai: correspondant à environ 5 mg de Brôme.

Fusion à la microbombe avec:

Na_2O_2..... 2 g
Sucre ..... 20 à 30 mg.

Il est indifférent d'ajouter ou non 200 à 300 mg de NO_3K.

Reprise par 50 ml d'eau environ, en tout.

Ebullition 15 minutes pour chasser H_2O_2, Neutralisation par ClH concentré, en présence de rouge de Méthyle; revenir à teinte jaune faible par NaOH N/1. Ajouter 200 mg de Sulfate d'Hydrazine. Faire bouillir dix minutes; revenir à teinte jaune par NaOH N/1.

Ajouter 5 ml de solution à 20% de PO_4KH_2 et 10 ml d'eau de Javelle à 28° chlorométriques. Porter juste à l'ébullition et ajouter immédiatement 5 ml de solution de Formiate de Soude à 50%. Faire bouillir 5 minutes.

Après refroidissement, diluer à 100 ml; ajouter:

Solution d'Iodure de Potassium à 10% ..... 10 ml
Acide sulfurique 5 N ..... 25 ml
Solution de Molybdate d'ammonium à 10% 2 ou 3 gouttes.

Titrer après 5 minutes avec de l'Hyposulfite N/50.

1 ml d'Hyposulfite correspond à 0,2664 g de Brôme.

Remarques.

1° *Sans réduction préalable* avec du Sulfate d'Hydrazine (ou encore avec un peu de sulfite) avant d'oxyder par l'Eau de Javelle, les résultats sont inconstants, souvent trop faibles. Nous n'avons pas l'explication du phénomène.

2° Les résultats sont meilleurs sur des essais témoins en partant de KBr que sur les essais en partant de produits organiques.

3° On a toujours un essai à blanc positif (qui pourrait être dû partiellement à la présence de Brôme dans l'hypochlorite). A cause de cet essai à blanc qui peut atteindre 0,3 à 0,4 ml d'hyposulfite l'incertitude croit pour les faibles teneurs en Brôme.

4° L'élimination du Chlore en excès par ébullition et passage de gaz inerte s'est révélée finalement moins commode que la destruction au Formiate.

5° En p_H *acide* les résultats sont trop faibles (oxydation imparfaite ou destruction partielle du Bromate).

6° En p_H alcalin, les essais à blanc sont considérables et irréguliers.

C. Dosage de l'Iode.

Le dosage de l'Iode est analogue à celui du Brôme. On se heurte cependant aux mêmes difficultés, mais moins accentuées. On obtient de bons résultats en opérant de la façon suivante:

Préparer le mélange suivant: 2 g Na_2O_2 — 150 mg de sucre. — En placer la moitié dans une microbombe et par dessus, 10 mg environ de substance à analyser, pesés au $^1/_{1000}$. Mélanger à l'aide d'une petite baguette de verre fine, et recouvrir du reste de Peroxyde et sucre.

Après avoir mis en place joint et couvercle, serrer la bombe dans son étrier et placer l'ensemble sur une petite flamme pendant 15 minutes.

Au bout de ce temps, retirer la bombe, la refroidir dans un bêcher d'eau distillée — desserrer l'étrier, ouvrir la bombe et la laver dans un petit bêcher ou mieux un tube profond et étroit avec de l'eau bidistillée bouillante.

Transvaser par aspiration dans un erlenmeyer de 250 ml. Laver le tube jusqu'à disparition de réaction alcaline. Le volume de liquide ne doit pas dépasser 50 ml.

Faire bouillir 15 minutes pour chasser l'eau oxygénée, *doucement*, pour éviter la formation abondante de mousse, pouvant provoquer des pertes — ajouter alors, sans refroidir, 5 gouttes d'acide formique à 20%, puis avec précaution (dégagement brusque de CO_2) de l'acide acétique cristallisable jusqu'à virage à la phénolphtaléine (il en faut de 2 à 3 ml). Mettre alors encore 5 ml de CH_3COCH.

Refroidir — ajouter de l'eau de Brôme jusqu'à coloration orangée persistant 5 minutes (il en faut environ 20 ml). Porter à l'ébullition jusqu'à décoloration et faire bouillir encore 10 minutes.

Refroidir — ajouter 10 ml IK 10%, 20 ml SO_4H_2 25% — attendre 5 minutes et titrer à l'hyposulfite N/50.

1 ml hypo N/50 0,423 mg I.

Exemples.

Poids de substance	Titre Hypo	Nombre ml hypo N/50	I %
	Essais sur *Iodopyrine* (I: 40,44%).		
7,788	0,994	7,56	40,83
5,867	—	5,63	40,36
6,924	—	6,63	40,25
7,565	—	7,37	40,73
	Essais sur *Iodoforme* (I: 96,7%)		
6,407	0,988	14,77	96,32
7,612	—	17,51	96,16
7,650	—	17,56	96,52

Remarques.

1° Au cours de la fusion la *majeure* partie de l'Iode passe à l'état d'iodate, mais non la totalité; un dosage direct de l'iodate donne des résultats déficitaires.

2° L'oxydation par le Brôme, sans addition préalable d'acide formique, conduit à des résultats nettement trop élevés. Nous avions tout d'abord attribué le fait à la présence de *périodate*. Ceci semble infirmé par le fait que le périodate est détruit par l'eau oxygénée alcaline à l'ébullition.

3° Les essais à blanc sont élevés et variables quand on diminue la quantité d'acide acétique ajouté après neutralisation, et cela surtout si on omet l'addition d'acide formique avant le Brôme.

L'addition d'acide formique *après* celle du Brôme n'améliore pas les résultats.

Il y a donc là un point à éclaircir.

Résumé.

Ce bref exposé montre que le dosage chimique direct, *rapide et sélectif* des divers halogènes, en micro ou semi-microanalyse, peut prêter encore à des controverses.

L'emploi de la microbombe se révèle très avantageux pour la minéralisation des substances organiques et peut être très utile soit pour le travail

en série, soit pour un laboratoire non équipé spécialement pour faire des microcombustions.

Mais le dosage des halogènes, après minéralisation par ce procédé exige des conditions de travail très précises, qui sont encore susceptibles d'être perfectionnées.

Il serait donc particulièrement souhaitable que les analystes qui s'intéressent à ces méthodes générales de micro ou semi-microdosages fassent connaître le résultat de l'expérience qu'ils ont pu acquérir sur ce sujet, non par quelques essais seulement mais par accumulation de résultats sur des produits très divers.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß die für eine mikrochemische oder halbmikrochemische Bestimmung der verschiedenen Halogene geeigneten schnellen und selektiven Methoden immer noch Anlaß zu Diskussionen geben. Die Anwendung der Mikro-*Parr*-Bombe erweist sich für die Zerstörung organischer Substanzen als sehr vorteilhaft, besonders wenn es sich um Serienanalysen handelt. Aber die eigentliche Bestimmung der Halogene nach dieser Art der Veraschung erfordert außerordentlich genaue Einhaltung der Versuchsbedingungen, die im übrigen noch zu vervollkommnen wären. Ein Erfahrungsaustausch der auf diesem Gebiet tätigen Mikroanalytiker wäre besonders wünschenswert, vor allem auch hinsichtlich der Anwendung auf verschiedene Analysenprodukte.

Summary.

It is shown that there is still room for the discussion of suitable rapid and selective methods for the microchemical or semi-microchemical determination of the various halogens. The micro *Parr* bomb has proven very advantageous for the destruction of organic substances, especially in series analyses. However, the actual determination of the halogens following this type of ashing demands exceptionally close maintenance of the experimental conditions, which are still to be perfected. An exchange of experiences of the microanalysts active in this field would be very desirable, particularly with respect to the use of the procedure on various analysis products.

Bibliographie.

[1] *J. F. Alicino, A. Crickenberger* et *B. Reynolds*, Analyt. Chemistry **21**, 755 (1949).

Laboratoire de Micro-analyse. Société des Usines Chimiques Rhône-Poulenc, Vitry-sur-Seine.

Microdétermination rapide des cendres sulfuriques dans les matières organiques (dosage des métaux alcalins).

Par

F. Martin.

Avec 1 figure.

(Reçu le 18 juillet 1950.)

La détermination des cendres sulfuriques, particulièrement en vue du dosage direct des métaux alcalins dans les substances organiques, apparaît à première vue comme une opération très simple.

Pratiquement, c'est une opération souvent longue et toujours délicate.

Il suffit de se reporter aux textes des ouvrages classiques *(Treadwell)* ou officiels (Pharmacopées) pour avoir une idée des précautions qui sont recommandées si on veut mener à bien la minéralisation.

Si l'opération est conduite sur une prise d'essai un peu forte (0.5 g à 1 g) elle peut parfois demander plusieurs heures.

Les difficultés principales sont les suivantes:

1° Combustion incomplète; élimination du charbon souvent très laborieuse.

2° «Champignonnage» excessif, la masse déborde du récipient.

3 Allumage des gaz de combustion; celle-ci s'emballe; pertes de substance.

4° Obligation de conduire *très lentement* la calcination; temps nécessaire très long.

5 Nécessité de reprendre plusieurs fois par un peu d'acide sulfurique.

6° Elimination délicate en fin de combustion, pour éviter les projections de l'acide en excès.

7° Transformation du sulfate acide en sulfate neutre nécessitant un chauffage à haute température, d'où risques de perte, par projections ou même par volatilisation.

8° Risques d'attaque du platine, ou combustion complète très difficile dans le quartz.

Par conséquent, la mise au point d'une méthode simple, micro ou semi-microanalytique, est susceptible de faire gagner beaucoup de temps à tous les laboratoires appelés à effectuer fréquemment de telles déterminations.

La technique résumée ci-après, éprouvée par de très nombreux essais, nous a donné dans presque tous les cas entière satisfaction.

Principe. La combustion est effectuée dans une nacelle de platine et dans un courant d'oxygène contenant un peu de gaz sulfureux. Le mélange donne de l'anhydride sulfurique au contact du platine qui sert de catalyseur. Les alcalis retiennent seulement la quantité de SO_3 nécessaire pour donner des sulfates alcalins.

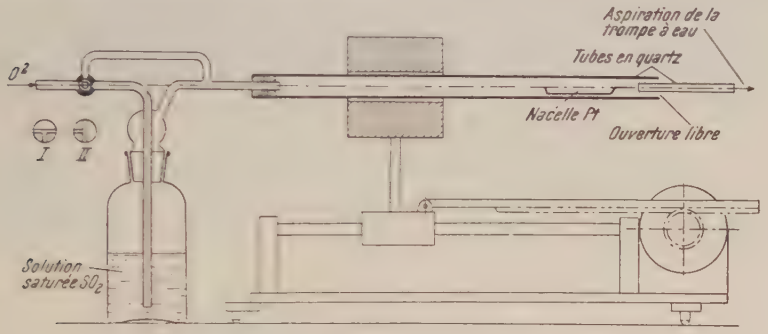


Fig. 1.

Appareillage. Très simple. Celui représenté par le schéma ci-joint a été conçu pour des déterminations en série, *semi-automatiques*.

Il comprend de gauche à droite:

1° Un flacon avec ajutages et robinet permettant d'amener soit de l'oxygène pur, soit de l'oxygène ayant barboté dans une solution saturée de SO_2.

2° Un tube à combustion de 20 à 25 cm de long et 10 à 12 mm de diamètre, relié par un bout à l'arrivée de l'oxygène: à l'autre bout, un autre tube de 5 à 6 mm pénètre de 0.5 à 1 cm et est reliée à la trompe; il est fixé sur un support mobile permettant de le déplacer pour introduire ou retirer la nacelle.

3° Une nacelle de platine, de 10 mm de long, 5 mm de haut et 5 mm de large (poids: 1,5 g), qui est placée dans le dernier tiers du tube à combustion.

4° Un four mobile de 6 à 7 cm de long à entraînement automatique, chauffant à volonté de 500 à 800°, et parcourant 6 à 8 cm en 30 minutes.

Marche de l'opération.

On pèse, suivant le cas, de 2 à 20 mg de substance, qu'on étale le plus possible dans la nacelle. On introduit celle-ci dans le tube à com-

bustion, le four étant repoussé à gauche, de façon que la nacelle soit en *dehors du four*; on met en place le tube d'aspiration relié à la trompe; on fait passer l'oxygène chargé de SO_2; on met le four (chaud) en marche. La combustion et la transformation des alcalis en sulfates se font alors automatiquement; la substance brûle au fur et à mesure de l'avance du four; dès que la nacelle est portée au rouge à son extrémité gauche, il commence à se former de l'anhydride sulfurique. Il se condense parfois un peu de SO_4H_2 au bout du tube; mais celui-ci disparaît à la fin de la combustion, quand le four chauffe à la fois la nacelle et l'extrémité du tube. On fait alors passer de l'oxygène seul pendant 5 minutes; on repousse le four, on laisse refroidir la nacelle quelques instants; puis on la retire, on la pose sur un bloc d'aluminium dans un dessicateur et on pèse après refroidissement complet ce qui demande quelques minutes seulement.

Résultats (Exemples).

Substance	Trouvé*	Théorie sur anhydre
NaCl	Na % 39,35	39,30
NaCl	Na % 39,40	39,30
CO_3Na_2	Na % 43,40	43,40
Salicylate de Na	Na % 14,56	14,38
Sulphophénate de Na	Na % 11,90	11,70
Benzoate de Na	Na % 16,15	15,95
Naphthalène disulfonate de Na	Na % 13,12	13,10
p-aminosalicylate de Na	Na % 10,75	10,90
p-aminosalicylate de Na	Na % 10,97	10,90
phtalate acide de K	K % 18,95	19,10

* Ces chiffres sont ramenés au produit sec.

Les exemples ci-dessus sont tous sauf un relatifs à des sels de sodium. Mais des résultats identiques sont obtenus avec les sels de potassium. Pour les autres métaux, il y a lieu de tenir compte de l'expérience et de la stabilité du sulfate correspondant: la température finale ne doit évidemment pas atteindre la température de décomposition du sulfate (SO_4Li_2—SO_4Ca—SO_4Sr—SO_4Mn ... etc.).

Remarques.

1° Lorsqu'on peut craindre de faire la minéralisation dans le platine, on place la substance dans une nacelle de quartz et on introduit, en avant de la nacelle, un tortillon de fil de platine qui sert de catalyseur pour la formation de SO_3.

2° Il n'est peut-être pas inutile de rappeler que la calcination *directe*, sans acide sulfurique, peut conduire à des pertes sérieuses de métaux

alcalins en présence d'halogènes (ClNa—ClK—ClLi ...) surtout lorsqu'on l'effectue dans le platine.

3° La méthode proposée a été étudiée spécialement pour le dosage des alcalins existant normalement dans le produit examiné. Elle peut évidemment être utilisée d'une façon plus générale:

a) Pour la détermination des cendres considérées comme impuretés; les tolérances moyennes (voir Pharmacopées) étant voisines de 0,1%, on pourra opérer sur une prise d'essai de 50 mg, ce qui correspond à un résidu maximum de 0,05 mg, facilement pesable avec une balance au centième, ou même sur 10 mg en pesant le résidu (max.: 0,01 mg) à la balance au millième.

b) Pour la minéralisation de substance contenant d'autres éléments, sauf ceux qui sont facilement volatils (As, Hg) ou pour lesquels on peut redouter des pertes (Sb par exemple).

Résumé.

La technique de la détermination des cendres sulfuriques décrite ci-avant, éprouvée par des centaines d'essais, nous a donné, dans presque tous les cas, entière satisfaction. La combustion est effectuée dans une nacelle de platine et dans un courant d'oxygène contenant un peu de gaz sulfureux. Le mélange donne de l'anhydride sulfurique au contact de platine qui sert de catalyseur. Les alcalis retiennent seulement la quantité de SO_3 nécessaire pour donner des sulfates alcalins. L'appareillage est très simple. Celui représenté par le schéma ci-joint a été conçu pour des déterminations en série, semi-automatiques. La méthode proposée a été étudiée spécialement pour le dosage des alcalins existant normalement dans le produit examiné. Elle peut évidemment être utilisée d'une façon plus générale.

Zusammenfassung.

Das beschriebene und in zahlreichen Versuchen erprobte Verfahren zur Rückstandbestimmung ergab durchaus befriedigende Resultate. Die Verbrennung wird in einem Platinschiffchen durchgeführt. Der zur Oxydation verwendete Sauerstoffstrom enthält geringe Mengen Schwefeldioxyd, welches durch die katalytische Wirkung des Platins zu Schwefelsäureanhydrid aufoxydiert und nur insoweit von anwesendem Alkali gebunden wird, als dies zur Bildung von Sulfat erforderlich ist. Die in der Abbildung wiedergegebene Apparatur ist sehr einfach und für die automatische Durchführung von Serienanalysen geeignet. Die in erster Linie für die Bestimmung der Alkalimetalle vorgeschlagene Methode ist im übrigen zu allgemeiner Anwendung geeignet.

Summary.

The technique, described above, of determining sulfuric ashes, and tested in hundreds of trials, has proven satisfactory in almost all cases. The combustion is made in a platinum boat, and in a stream of oxygen containing a

little sulfurious gas. The mixture produces sulfuric anhydride in contact with the platinum which serves as catalyst. The alkalies retain only the quantity of SO_3 necessary to form the alkaline sulfates. The equipment is very simple. The set-up shown in the sketch has been designed for semi-automatic determinations in series. The proposed method has been studied particularly for the determination of alkalies existing normally in the product being examined. It obviously may be used in a more general fashion.

Discussion.

Mr. *R. Lévy* (Paris): Est il complètement inutile d'introduire la nacelle de platine dans un cylindre de platine pour eviter les microprojections de l'acide ? — Quel est l'ordre de grandeur du debit d'oxygène ?

Mr. Prof. *F. Martin*: D'une façon générale: oui. Dans quelques cas particuliers il faut utiliser peu de substance et l'étalon dans le fond de la nacelle. — Comme pour le dosage du carbone et de l'hydrogène.

Centre de microchimie analytique et préparative, Chimie générale organique.
Université de Liége.

Le microdosage de l'azote amidé et α aminé par la méthode aux acides chlorhydrique et nitrique concentrés.

Par

M. Renard* et Paulette Deschamps.

Avec 1 figure.

(Reçu le 18 juillet 1950.)

Nous avons entrepris l'étude de la réaction qui est à la base de la méthode de microdosage que nous proposons aujourd'hui, à la suite de la lecture d'un brevet publié dans le «Friedländer»[1]. Ce brevet mentionne la réaction que voici: En chauffant au bain d'eau les acides α aminés suivants: glycocolle, leucine et acide aspartique en présence d'un mélange à parties égales d'acide chlorhydrique et nitrique concentrés, on obtient avec un très bon rendement les acides α chlorés correspondants. Il se produit d'autre part un *dégagement abondant d'azote* dont la cessation indique le terme de la réaction. Le brevet ne donne aucune équation chimique correspondant à cette transformation; or si l'on veut écrire cette équation, on constate qu'elle ne peut s'écrire que sous la forme:

$$2\,R\cdot CHNH_2\cdot COOH + 2\,HNO_3 + 6\,HCl \rightarrow 2\,R\cdot CHCl\cdot COOH + 2\,N_2 + 2\,Cl_2 + 6\,H_2O.$$

On doit donc obtenir, par môle d'acide aminé, un dégagement d'une môle d'azote et d'une môle de chlore. Or, si en se plaçant dans les conditions indiquées par le brevet, on effectue un dosage quantitatif des gaz dégagés, on constate:

1° que la quantité de chlore obtenue est variable mais qu'elle ne dépasse jamais le rapport de 0,2 môle de chlore par môle d'acide aminé.

2° que l'on obtient un autre gaz dans la proportion de 1 môle de gaz par môle d'acide aminé.

---

* Actuellement chargé de cours à l'Institut Agronomique de l'Etat à Gembloux.

Nous avons alors pensé à écrire la réaction de la façon suivante:

$$R \cdot CHNH_2 \cdot COOH + HNO_3 + HCl \rightarrow R \cdot CHCl \cdot COOH + N_2O + 2\,H_2O.$$

Le dégagement gazeux serait non pas de l'azote mais de l'*oxyde azoteux*. Un essai qualitatif confirme cette hypothèse, le gaz dégagé au cours de la réaction rallume nettement un copeau présentant un point en ignition. Le dosage quantitatif montre d'autre part que ce gaz renferme jusqu'à 95% de N_2O, le restant étant de l'azote. Le rapport N/N_2O est variable comme d'ailleurs la quantité de chlore formée. Il est alors

Fig. 1.

logique d'admettre que la réaction initiale donne bien N_2O, la formation d'azote et de chlore étant due à une réaction secondaire: $N_2O + 2\,HCl = N_2 + Cl_2 + H_2O$.

Cette réaction apparait alors comme la décomposition d'un nitrate d'amine en présence d'acide chlorhydrique[2], elle est comparable à une réaction bien connue, la décomposition du nitrate ammonique par la chaleur: $NH_4NO_3 = N_2O + 2\,H_2O$.

Au point de vue du dosage volumétrique, le fait d'obtenir N_2O ou N_2 n'a d'ailleurs aucune espèce d'importance puisqu'en volume ils sont équivalents.

L'étude quantitative à l'échelle macro (prise d'essai 0,2 g), nous a montré que le volume de gaz recueilli sur une solution de potasse à 50% correspond rigoureusement à l'azote α aminé de la molécule.

Cette constatation nous a permis d'élaborer à l'échelle semi-micro (prise d'essai 20 à 30 mg) une méthode de dosage de l'azote α aminé[3],

méthode que nous avons étendue aux amides[4]. Les résultats obtenus étant entièrement satisfaisants, nous avons maintenant mis au point la méthode à l'échelle micro (prise d'essai 2 à 5 mg).

L'appareil utilisé est extrêmement simple (figure 1) et se compose d'un générateur à neige carbonique relié par un robinet à fin règlage à une des branches d'un tube en U. (Ce tube a 0,5 cm de diamètre et 4 cm de hauteur. La branche horizontale a 2 cm de longueur.) L'autre branche du tube en U est reliée par un tube dont la branche descendante est capillaire à un laveur (9 cm de haut, 1 cm de diamètre) contenant une solution saturée de $KHCO_3$. Au laveur fait suite un robinet à 3 voies conduisant au microazotomètre qui contient une solution de potasse à 50%.

Le mode opératoire est le suivant: La prise d'essai (2 à 5 mg) est pesée directement dans le tube en U à la microbalance. On introduit ensuite dans le tube, à l'aide de micropipettes calibrées, 10 λ d'acide nitrique concentré incolore pur pour analyse (d = 1,4) et 20 λ d'acide chlorhydrique concentré pur pour analyse (d = 1,19).

On raccorde le tube en U à l'appareil et on purge celui-ci d'air par un courant rapide de CO_2. On établit alors un courant lent de CO_2 et on vérifie que l'appareil est bien purgé d'air par absorption du CO_2 dans la potasse de l'azotomètre. En maintenant le courant de CO_2, on plonge alors le tube en U pendant 45 minutes dans un bain d'eau chauffé à 70°. On retire ensuite le bain d'eau et on achève l'entraînement dans l'azotomètre du gaz formé au cours de la réaction par le même courant lent de CO_2. On abandonne le gaz sous pression dans l'azotomètre pendant 10 à 15 minutes puis on fait la lecture du volume.

Le % d'azote est donné par la formule: $\%\ N_2 = \frac{0{,}04492\,P \cdot V}{2\,T \cdot s}$ où P = Pression atmosphérique, V = Volume recueilli, T = Température absolue, s = Poids de la prise d'essai.

Comme on le voit, l'appareillage et le mode opératoire sont extrêmement simples. On appréciera d'autre part la précision de la méthode en examinant notamment les résultats suivants obtenus pour huit dosages effectués sur la butanamide et sur la phénylacétamide:

	Prise d'essai mg	% N_2 trouvé
Butanamide:	3,040	16,04
	4,560	16,23
	4,529	16,06
	4,335	16,13
	3,892	16,21
	2,926	16,12
	3,012	16,04
	2,877	16,10
	moyenne:	16,11 ± 0,06

% N_2 calculé: 16,09.

	Prise d'essai mg	% N_2 trouvé
Phénylacétamide:	2,618	10,41
	2,751	10,39
	4,341	10,40
	3,460	10,38
	4,328	10,32
	3,973	10,25
	2,728	10.26
	3,462	10,46
		moyenne: 10,35 ± 0,06

% N_2 calculé: 10,37.

La moyenne des résultats donnent en effet d'une part 10,35 ± 0,06 pour 10,37 calculé et d'autre part 16,11 ± 0,06 pour 16,09 calculé. Voici d'autre part quelques résultats obtenus à partir d'acides α aminés.

Acides α aminés	Prise d'essai mg	% N_2	
		trouvé	calculé
Glycocolle	2,562	18,75	18,66
	2,311	18,66	
Alanine	3,695	15,63	15,72
	2,411	15,68	
Norvaline	1,800	11,97	11,96
	3,141	11,99	
Valine	2,496	11,76	11,96
	5,025	11,93	
Norleucine	4,165	10,59	10,68
	5,507	10,52	
Leucine	5,182	10,68	10,68
	2,284	10,71	
Isoleucine	3,782	10,71	10,68
	3,961	10,64	
Acide aspartique	3,972	10,54	10,53
	4,011	10,70	
Acide glutamique	6,701	9,58	9,52
	7,101	9,72	
Phénylalanine	3,963	8,49	8,48
	6,004	8,60	

De même pour les amides, le tableau suivant donne quelques uns des résultats obtenus:

Amides	Prise d'essai mg	% N_2	
		trouvé	calculé
Acétamide	3,200	23,65	23,73
	3,478	23,79	
Propanamide	2,976	18,97	19,17
	2,999	19,11	
Benzamide	4,281	11,58	11,57
	6,422	11,57	
Asparagine	2,223	18,60	18,66
	4,446	18,87	

La méthode permet également le dosage de l'azote de sulfamides. Il faut cependant, dans ce cas, faire l'adjonction des acides chlorhydrique et nitrique concentrés en plaçant le tube en U dans un bain d'eau glacée et le maintenir dans ce bain pendant que l'on purge l'appareil d'air. Signalons à ce sujet qu'un brevet russe récemment mentionné dans la littérature[5], applique au dosage des sulfamides un principe semblable, le mélange utilisé étant constitué par de l'acide sulfurique concentré et du nitrate potassique.

Enfin l'azote des acides sulfoniques α aminé est également dosable par la méthode, mais, dans ce cas, il vaut mieux doubler la quantité d'acide nitrique utilisée.

Voici à titre d'exemple les résultats donnés par la benzènesulfamide et par la taurine:

	Prise d'essai mg	% N_2	
		trouvé	calculé
Benzènesulfamide	6,327	8,79	8,91
	5,408	8,91	
Taurine	4,400	11,03	11,20
	2,256	11,17	

En résumé, lorsque la molécule n'est pas susceptible de donner des réactions secondaires avec l'acide nitrique, la méthode simple que nous venons de décrire permet à l'échelle micro le dosage précis de l'azote aminé des acides α aminés et des acides α amino-sulfoniques ainsi que le dosage de l'azote amidé des amides et des sulfonamides.

Résumé.

L'étude de la réaction du mélange acides chlorhydrique et nitrique concentrés sur les acides α-monoaminés monocarboxylés a montré que celle-ci s'effectue d'après le schéma:

$$R\text{-}CHNH_2\text{-}COOH + HCl + HNO_3 \rightarrow R\text{-}CHCl\text{-}COOH + N_2O + 2\,H_2O.$$

L'étude quantitative de cette réaction a, en particulier, montré que le volume de gaz recueilli correspond rigoureusement à l'azote aminé de la molécule. Cette constatation nous a permis, lorsque la molécule n'est pas susceptible de donner des réactions secondaires avec l'acide nitrique, de développer à l'échelle micro une méthode simple et précise de dosage de l'azote aminé des acides α-aminés et des acides α-aminosulfonique ainsi que de l'azote amidé des amides et des sulfonamides.

Zusammenfassung.

Das Studium der Umsetzung eines Gemisches von konzentrierter Salzsäure und Salpetersäure mit α-Monoaminomonocarbonsäuren ergab die Erkenntnis folgenden Reaktionsablaufes:

$$R{-}CHNH_2{-}COOH + HCl + HNO_3 = R{-}CHCl{-}COOH + N_2O + 2\,H_2O.$$

Die quantitative Untersuchung dieser Reaktion ergab im besonderen, daß das erhaltene Gasvolumen dem vorhandenen Aminostickstoff genau entspricht. Sofern die Substanz keiner Sekundärreaktion mit Salpetersäure unterliegt, ermöglichte diese Feststellung die Ausarbeitung einer einfachen und genauen Mikrobestimmung des Aminostickstoffes in α-Aminosäuren und α-Aminosulfonsäuren und ebenfalls des Amidostickstoffes in Amiden und Sulfonamiden.

Summary.

The study of the reaction of a mixture of concentrated hydrochloric acid and nitric acid on the mono-carboxylated α monamines has shown that it proceeds:

$$R{-}CHNH_2{-}COOH + HCl + HNO_3 = R{-}CHCl{-}COOH + N_2O + 2\,H_2O.$$

The quantitative study of this reaction has proved, in particular, that the volume of gas collected corresponds rigorously to the amine nitrogen of the molecule. This finding has made it possible for the authors, provided the molecule is not susceptible to yielding secondary reactions with nitric acid, to develop on the microscale, a simple and precise method of determining the amine nitrogen of α amino acids and α aminosulfonic acids, as well as the amide nitrogen of amides and sulfonamides.

Bibliographie.

[1] *P. Friedländer*, Fortschritte der Teerfarbenfabrikation. Vol. XIV, Julius Springer Berlin, 1926, p. 1435; Chem. Zbl. **1921**, IV, 1140; **1922**, II, 873.

[2] *M. Renard*, Mém. soc. roy. scien. Liége, 4e sér., tome VII (1946).

[3] *M. Renard*, Acad. roy. de Belg. Bull. Classe des scien. 5e sér., XXXI, 219 (1945).

[4] *M. Renard* et *J. Médart*, Bull. soc. roy. sci. Liége, **11**, 409 (1949).

[5] *N. V. Khromov-Borisov*, Chem. Abstr. **43**, 4604 g (1949).

Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Das Verhalten von Ringstickstoff bei der Mikromethode nach Kjeldahl.

Von

Margherita Marzadro.

(Eingelangt am 6. Juni 1950.)

Bekanntlich läßt sich der Stickstoff der heterocyklischen Verbindungen und im besonderen der Pyridin-, Chinolin- und Isochinolinderivate mit der normalen *Kjeldahl*-Methode nur schwer bestimmen, da diese Substanzen bei der Veraschung den Stickstoff überhaupt nicht oder nur teilweise freigeben. Besonders in der Mikroanalyse wurden zahlreiche Versuche gemacht, um ein Veraschungsverfahren zu finden, mit welchem auch bei cyklischen Verbindungen genaue Ergebnisse erzielt werden können. *Bradstreet*[1] hat eine ausführliche Literaturübersicht über dieses Thema veröffentlicht, welche jedoch keine Angaben über die heterocyklischen Verbindungen enthält. *Acree*[2] ist es unter Verwendung von Quecksilbersalzen als Katalysator und Verlängerung der Veraschungszeit auf zwei Stunden gelungen, gute Resultate für das Chinin-Hydrobromid zu erhalten, er findet jedoch nur 25% des in der Nicotinsäure vorhandenen Stickstoffes wieder. Nach *Clark*[3] erhält man gute Resultate für Pyridin und Chinolin, wenn man den Aufschluß in Gegenwart von Kaliumsulfat und Quecksilbersalzen über zwei Stunden ausdehnt. Auch *Phelps* und *Daud*[4] erhalten einen vollkommenen Aufschluß in zweieinhalb Stunden mit der Mischung von *Clark*, *Eleck* und *Sobotka*[5] reduzieren zuerst mit Glukose und schließen dann mit einem Gemisch von Schwefelsäure, Kaliumsulfat und Kupfersulfat auf. Zahlreiche andere Autoren[6] führen den Aufschluß in Gegenwart von Selen allein oder mit Perchlorsäure oder Kupfer aus. Andere[7] machen darauf aufmerksam, daß das Selen bei langer Aufschlußzeit Stickstoffverluste verursachen kann. *Belcher* und *Godbert*[8] erhalten gute Resultate mit einer Halbmikromethode, indem sie Nicotin- und Chinolinsäure mit Schwefelsäure in Gegenwart von Selen und Quecksilbersulfat

aufschließen; *Miller*[9] erhält bei Anwendung desselben Katalysators nur dann gute Resultate, wenn die Aufschlußzeit auf sechs Stunden ausgedehnt wird. *Shirley* und *Becker*[10] erhalten gute Werte mit Selenoxychlorid und metallischem Quecksilber nach vierstündiger Veraschung. Andere Autoren[11] zersetzen die Substanz in Gegenwart von Kaliumpermanganat; *C. O. Willits* und Mitarbeiter[12] erhalten gute Ergebnisse bei Pyridin und Chinolinstickstoff, wenn durch mindestens vier Stunden hindurch mit einer Selen, Quecksilberoxyd und Kaliumsulfat enthaltenden Mischung aufgeschlossen wird. Auch *Dakin*[13] beobachtet, daß nach vierstündigem Aufschluß mit einer Mischung, die Kaliumsulfat und Kupfersulfat enthält, Chinolin und Nicotin den ganzen Stickstoff abgeben, während Pyridin und seine Derivate selbst nach dieser Zeit nur teilweise angegriffen sind.

Einige zufällige Beobachtungen ließen mich die Möglichkeit in Betracht ziehen, die verschiedene Geschwindigkeit auszunützen, mit der die differenten Stickstofformen, der Ringstickstoff und der Seitenkettenstickstoff, die in ein und derselben heterocyklischen Verbindung zugegen sind, sich in Ammoniumsulfat umsetzen, um diese dann getrennt zu bestimmen. Es handelt sich kurz gesagt darum, geeignete Veraschungsmodalitäten festzusetzen, die es ermöglichen, alle anderen Stickstoffformen, mit Ausnahme des Ringstickstoffes, quantitativ in Ammoniumsulfat umzusetzen.

Es war übrigens vorauszusehen, daß eine genaue Sonderung nicht in allen Fällen möglich sein wird, da die Anwesenheit gewisser Gruppen im heterocyklischen Ring, diesen gegen den Angriff mit Schwefelsäure weniger widerstandsfähig machen könnte. Ich habe mir daher vorgenommen zu untersuchen, ob gewisse allgemeine Regeln existieren.

Schon nach einigen Versuchen konnte ich beobachten, daß mit einer bestimmten Zusammensetzung der zur Veraschung angewendeten Mischung und bei Beobachtung gewisser Modalitäten, welche im experimentellen Teil beschrieben sind, genaue Ergebnisse für den Seitenkettenstickstoff allein erzielbar sind.

Die Methode ist im wesentlichen eine Abänderung der Mikromethode nach *Friedrich*[14], wobei vorerst mit Jodwasserstoffsäure und rotem Phosphor reduziert wird und dann mit Schwefelsäure, Quecksilbersalz und Kaliumsulfat aufgeschlossen wird. Das durch Alkalisieren entbundene und abdestillierte Ammoniak wird mit der von mir a. a. O. beschriebenen Methode[15], durch kolorimetrische Bestimmung des mit *Nessler*-Reagens erhaltenen Komplexes, bestimmt.

Mit dieser neuen Technik wurden zahlreiche heterocyklische Stickstoffverbindungen analysiert und im besonderen Pyridin-, Chinolin- und Isochinolinderivate, welche außer dem Ringstickstoff auch Seitenkettenstickstoff enthalten, und zwar Amino-, Amido-, Nitro-, Nitroso-

und Azoverbindungen sowie Dinitrohydrazine, Osazone und Oxime. Einige dieser Substanzen sind im Handel erhältlich und wurden genauestens gereinigt, andere wurden freundlicherweise vom chemischen und chemisch-therapeutischen Laboratorium dieses Institutes zur Verfügung gestellt. Alle diese Substanzen wurden nach zwei verschiedenen Methoden analysiert, einmal nach dem neuen hier angegebenen Verfahren und einmal nach der Methode von *Dumas-Zimmermann*[16], mit der man den Gesamtstickstoff auch bei heterocyklischen Verbindungen mit großer Genauigkeit bestimmen kann. Durch Abziehen des nach der ersten Methode erhaltenen Wertes vom zweiten, erhält man den Ringstickstoff.

Wie aus den Tabellen klar zu ersehen ist, stimmen die berechneten und die gefundenen Werte bei den Verbindungen, in denen der Ring nicht angegriffen wird, innerhalb der Fehlergrenze genau überein. In den anderen Fällen, in denen der Ring zerstört wird, ergeben beide Verfahren die gleichen Werte. Diese Feststellung ist besonders interessant; obwohl die Zahl der Versuche, um allgemein anwendbare Regeln feststellen zu können, noch klein ist, kann man auf Grund der bisher untersuchten Verbindungen schon eine klare Abgrenzung zwischen Verbindungen mit „stabilem" und „angreifbarem" Ring erkennen, je nach der Art und Stellung der Substituenten. An Hand der Versuche kann man bis jetzt folgende Regeln festsetzen:

I. Bei der Veraschung mit Schwefelsäure und unter den in dieser Mitteilung festgelegten Bedingungen wird der Ringstoff von Pyridin-, Chinolin- und Isochinolinverbindungen nicht freigegeben, wenn:

a) kein Substituent vorhanden ist,

b) die Substitution, welcher Natur sie auch sei, am Benzolring stattgefunden hat (bei Chinolin- und Isochinolinverbindungen),

c) die Substituenten des heterocyklischen Ringes durch ein Kohlenstoffatom an den Ring gebunden sind (ohne Rücksicht auf die Stellung),

d) ein Hydroxyl in Stellung 4 zum Ringstickstoff vorhanden ist,

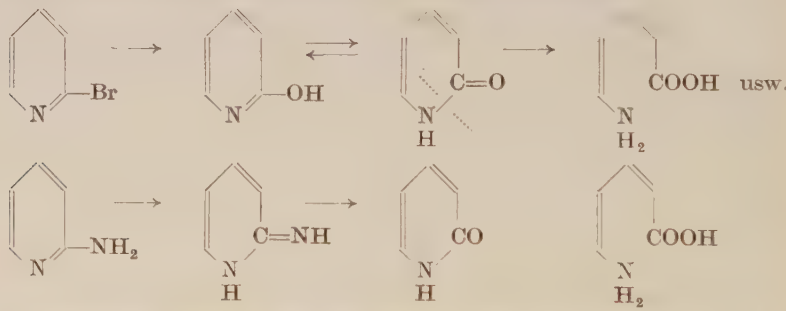
e) ein Halogenatom in Stellung 3 zum Ringstickstoff steht.

II. Unter den gewählten Versuchsbedingungen geben jene Derivate der drei obengenannten Ringverbindungen den Ringstickstoff bei der Veraschung quantitativ ab, welche eine Aminogruppe oder ein Halogenatom in Orthostellung zum Ringstickstoff aufweisen.

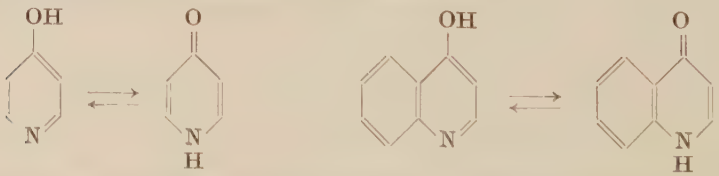
Aus den Tabellen ist leicht ersichtlich, daß bei allen analysierten Substanzen diese Regeln streng eingehalten sind.

Es scheint mir angebracht, eine kurze Erläuterung dieser empirischen Regeln zu geben. Sie sind übrigens leicht begreiflich, wenn man an die große Resistenz denkt, die der Pyridinring bei der Oxydation mit Schwefelsäure auch bei hoher Temperatur aufweist. Bekanntlich läßt

sich Pyridin nur unter sehr drastischen Bedingungen sulfonieren[17], und auch in diesem Falle wird der Ring nicht zerstört. Ebenso ist erwiesen, daß Chinolin bei hoher Temperatur mit Schwefelsäure und Selen in Nicotinsäure[18] umgesetzt wird und daß bei Alkylpyridinen durch dasselbe Reagens die Seitenkette oxydiert wird, während der Ring intakt bleibt. Daraus ergeben sich die bei I, a, b, c, angeführten Regeln. Interessant ist das Verhalten der Hydroxylderivate in Stellung 4 und des 2-Halogen- oder 2-Amino-pyridins oder -Chinolins. Bei den in 4 substituierten Hydroxylderivaten, die man formell den Phenolen der aromatischen Reihe gleichstellen kann, beobachtet man große Resistenz, während das Ringsystem instabil wird, sobald das Hydroxyl in 2 steht. Man kann eine Erklärung dafür finden, wenn man bedenkt, daß der Substituent in Stellung 2 leicht durch Hydroxyl substituiert werden kann: es entsteht somit ein 2-Oxypyridin (oder -Chinolin), welches die bekannte tautomere Form α-Pyridon (bzw. α-Chinolon) aufweist; letzteres ist im wesentlichen ein cyklisches Amid, welches daher durch hydrolytische Wirkung der Öffnung des Ringes unterliegt.



Die amidische Bindung ist hingegen in der tautomeren Form des 4-Oxypyridins bzw. -chinolins nicht vorhanden.



Wenn diese Voraussetzungen stimmen, müssen auch die Pyridin- oder Chinolinderivate mit der Aminogruppe oder dem Halogenatom in 4 sich als resistent erweisen, was ich nächstens kontrollieren werde.

Um eine systematische Prüfung der Wirkung der Art und Stellung der verschiedenen Funktionen auf die Angreifbarkeit des heterocyklischen Ringes zu erreichen, müssen noch zahlreiche Versuche gemacht werden (einige davon sind schon im Gange). Die Versuche werden auch auf ähnliche Ringsysteme mit zwei oder mehr Stickstoffatomen aus-

gedehnt, um das Gebiet der Anwendbarkeit der hier vorgeschlagenen Methode zu bestimmen und zu begrenzen.

Die bisher erhaltenen Ergebnisse lassen schon jetzt die Möglichkeit erkennen, bei einer großen Anzahl von Verbindungen eine neue analytische Charakteristik festzusetzen, die bei der Lösung struktureller Probleme auf dem Gebiete der cyklischen Stickstoffverbindungen von großem Nutzen sein und auf rein analytischem Gebiete mannigfaltige Möglichkeiten bieten kann.

Experimenteller Teil.

Das angewandte Verfahren ist im wesentlichen jenes von *Friedrich*, welches von *Pregl*[19] beschrieben ist; als Apparatur wurde die von *Parnas-Wagner*[20] verwendet.

Es werden 2 bis 4 mg Substanz eingewogen, mit ungefähr 3 mg rotem Phosphor und 1 ml Jodwasserstoffsäure von der Dichte 1,7 versetzt

Tabelle 1.

Pyridinderivate	Bruttoformel	% Gesamtstickstoff nach *Dumas-Zimmermann*		% Stickstoff außerhalb des Ringes mit modifiziertem Kjeldahl		% Ringstickstoff aus Differenz	
		ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
1. 3,5-Dibrom-pyridon	$C_5H_3ONBr_2$	5,54	5,74	0	0	5,54	5,74
2. Pyridin	C_5H_5N	17,72	17,60	0	0	17,72	17,60
3. α-Brom-pyridin*.....	C_5H_4NBr	8,87	8,72	—	8,78	—	
4. α-Amino-pyridin*.....	$C_5H_6N_2$	29,79	29,58	—	29,80	—	—
5. Nicotin-amid .	$C_6H_6ON_2$	22,96	22,91	11,48	11,52	11,48	11,39
6. Äthylen-bis--pyridinbromid	$C_{12}H_{14}N_2Br_2$	8,09	8,08	0	0	8,09	8,08
7. Para-methoxy-phenylnicotin-amid.....	$C_{13}H_{12}O_2N_2$	12,28	12,21	6,14	5,97	6,14	6,24
8. Phenyl-isopropyl-nicotin-amid.....	$C_{15}H_{16}ON_2$	11,66	11,60	5,80	5,82	5,80	5,78
9. Phenyl-äthyl-nicotin-amid-jodomethylat .	$C_{15}H_{17}ON_2J$	7,60	7,66	3,80	3,80	3,80	3,86
10. N-Phenyl-isopropyl-N-äthylnicotin-amid-picrat ...	$C_{23}H_{23}O_8N_5$	14,08	14,18	11,28	10,96	2,80	3,22

* Der Ring wird gespalten und man erhält den Gesamtstickstoff.

Tabelle 2.

Chinolinderivate	Bruttoformel	% Gesamtstickstoff nach *Dumas-Zimmermann*		% Stickstoff außerhalb des Ringes mit modifiziertem Kjeldahl		% Ringstickstoff aus Differenz	
		ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
11. 5-7-Dinitro-8-oxy-chinolin.	$C_9H_5O_5N_3$	17,87	17,96	11,92	11,81	5,95	6,15
12. 3-Bromchinolin	C_9H_6NBr	6,73	6,63	0	0	6,73	6,63
13. 8-Nitrochinolin	$C_9H_6O_2N_2$	16,09	15,85	8,04	7,91	8,04	7,94
14. 5-Nitroso-8-oxy-chinolin.	$C_9H_6O_2N_2$	16,09	16,09	8,04	8,15	8,04	7,94
15. 8-Oxychinolin	C_9H_7ON	9,65	9,62	0	0	9,65	9,62
16. 4-Oxy-2 methyl-chinolin ..	$C_{10}H_9ON$	8,81	8,96	0	0	8,81	8,96
17. Bromhydrat des 6-Methoxy-8-amino-chinolins	$C_{10}H_{11}ON_2Br$	10,98	11,05	5,49	5,40	5,49	5,65
18. 5-Acetyl-8-oxychinolin .	$C_{11}H_9O_2N$	7,49	7,31	0	0	7,49	7,31
19. Oxim des 5-Acetyl-8-oxy-chinolins	$C_{11}H_{10}O_2N_2$	13,86	13,63	6,93	6,82	6,93	6,81
20. Iodomethylat des 6-Methoxy-8-amino-chinolins	$C_{11}H_{13}ON_2J$	8,86	8,89	4,43	4,42	4,43	4,65
21. 5-Benzolazo-8-oxychinolin	$C_{15}H_{11}ON_3$	16,86	16,72	11,24	11,22	5,63	5,50
22. 2-Phenylcinchoninsäure...	$C_{16}H_{11}O_2N$	5,62	5,65	0	0	5,62	5,65
23. Nitrophenylhydrazon des Acetyl-8-oxy-chinolins	$C_{17}H_{14}O_3N_4$	17,39	17,33	13,03	12,96	4,36	4,37
Isochinolinderivate							
24. Isochinolin ...	C_9H_7N	10,78	10,69	0	0	10,78	10,69
25. Papaverinchlorhydrat ..	$C_{20}H_{21}O_4N.HCl$	3,72	3,54	0	0	3,72	3,54

Anmerkung: Die Substanzen 2, 3, 4, 12, 13, 22 sind Handelsprodukte. Die Substanzen 5, 7, 8, 9, 10 sind im Chemischen Laboratorium, 1, 6, 11, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 23 im Laboratorium für Therapeutische Chemie des Istituto Superiore di Sanità hergestellt worden.

und 30 Min. in gelindem Kochen erhalten. Hierauf spült man den Hals des Veraschungskölbchens mit 7 bis 8 ml bidestilliertem Wasser, setzt 2 ml konz. Schwefelsäure hinzu und läßt eine Stunde stark sieden. Nach diesem Zeitraum ist die gesamte Jodwasserstoffsäure und das Jod abdestilliert. Man setzt nun zirka 10 mg Quecksilberacetat und zirka 70 mg Kaliumsulfat zu und läßt nochmals 30 Min. stark kochen. Nach Abkühlung verdünnt man mit einigen ml bidestilliertem Wasser und führt die Destillation nach Alkalisierung mit 17 ml Alkalilösung (35% Kaliumhydroxyd und 5% Natriumthiosulfat) aus. Man fängt das Ammoniak in bidestilliertem Wasser auf, füllt je nach der vorhandenen Ammoniakmenge auf 50, 100 oder 200 ml auf und gibt 1 ml *Neßler*-Reagens dazu. Man liest am *Pulfrich*schen Photometer unter Benützung des Filters S 43 und der 3 cm-Küvette, wie in einer früheren Arbeit[15] beschrieben ist, ab.

Für jede Serie von Bestimmungen muß eine Leerprobe ausgeführt werden. Die erhaltenen Resultate sind in Tab. 1 und 2 zusammengefaßt.

Ich möchte an dieser Stelle Herrn Prof. *Raffaello Fusco* für sein an dieser Arbeit bewiesenes Interesse und seine wertvollen Ratschläge meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

Zusammenfassung.

Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ringstickstoff und Seitenkettenstickstoff läßt sich letzterer nach Reduktion der Substanz mit Jodwasserstoffsäure und rotem Phosphor durch Aufschluß mit konz. Schwefelsäure, Quecksilberacetat und Kaliumsulfat nach*Kjeldahl* bestimmen. Aus der Differenz gegen den nach *Dumas-Zimmermann* ermittelten Gesamtstickstoffgehalt wird der Anteil der Substanz an Ringstickstoff bestimmt. Die bisher untersuchten Substanzen lassen erkennen, daß bei der beschriebenen Modifikation des *Kjeldahl*-Verfahrens der stickstoffhaltige Ring nur unter bestimmten strukturellen Voraussetzungen angegriffen wird. Die daraus ableitbaren Regeln werden diskutiert und bieten neue Möglichkeiten zur Erforschung struktureller und analytischer Probleme.

Summary.

The *Kheldahl* method can be applied when both ring nitrogen and side chain nitrogen are present, if the latter is reduced with hydriodic acid and red phosphorus, followed by digestion with conc. sulfuric acid, mercuric acetate and potassium sulfate. The content of the substance in ring nitrogen is found from the difference between the total nitrogen obtained by the *Dumas-Zimmermann* procedure. The materials studied up now show that in the modification of the *Kheldahl* method just described, the nitrogen-bearing ring is attacked only under certain structural conditions. The rules derived from these findings are discussed. They offer new possibilities for the study of structural and analytical problems.

Résumé.

Dans le cas de la présence simultanée de l'azote dans le noyau et les chaînes latérales, on peut doser ce dernier par réduction de la substance à l'aide d'acide iodhydrique et de phosphore rouge, suivie d'une attaque à l'aide d'acide sulfurique concentré, d'acétate de mercure et de sulfate de potassium suivant *Kjeldahl*. On détermine l'azote cyclique de la substance par différence avec l'azote total trouvé par la méthode de *Dumas-Zimmermann*. Les substances étudiées jusqu'ici montrent que le cycle azoté n'est attaqué que suivant des positions structurales définies en suivant le procédé modifié de *Kjeldahl* que l'on vient de décrire. Les lois qui en dérivent sont discutées et offrent de nouvelles possibilités pour la recherche des problèmes structuraux et analytiques.

Diskussion.

H. Prof. *O. Högl* (Bern, Schweiz): Hat der Katalysator einen Einfluß auf das Resultat?

Fr. *M. Marzadro:* Ja! Andere, besonders Selen enthaltende Mischungen wirken drastischer, aber hauptsächlich ist auf die Dauer des Aufschlusses zu achten.

Literatur.

[1] *R. B. Bradstreet*, Chem. Reviews **27**, 331 (1946).

[2] *F. Acree*, J. Ass. Off. Agr. Chem. **24**, 648 (1941).

[3] *E. P. Clark*, J. Ass. Off. Agr. Chem. **24**, 641 (1941).

[4] *J. K. Phelps* und *H. W. Daudt*, idem **3**, 218 (1919).

[5] *A. Elek* und *H. Sobotka*, J. Amer. Chem. Soc. **48**, 501 (1926).

[6] *I. Ribas Marqués* und *F. López*, Chem. Abstr. **42**, 8707 h (1948). — *G. R. Korek*, Chem. Abstr. **37**, 1671 (1943). — *H. M. Rauen* und *M. Buchka*, Chem. Abstr. **43**, 521 c (1949).

[7] *R. S. Dalrymple* und *S. Brook King*, Ind. Engng. Chem. Analyt. Ed. **17**, 403 (1945). — *S. M. Patel* und *A. Sreenivasan*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **20**, 63 (1948). — *R. B. Bradstreet*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **12**, 657 (1940).

[8] *R. Belcher* und *A. L. Godbert*, J. Soc. Chem. Ind. **60**, 196 (1941).

[9] *L. Miller* und *G. A. Houghton*, J. Biol. Chem. **159**, 373 (1945).

[10] *R. L. Shirley* und *W. W. Becker*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **17**, 437 (1945).

[11] *O. Sakur*, Bull. soc. chim. France, 270 (1949).

[12] *C. L. Ogg*, *W. Ruth* und *C. O. Willits*, J. Ass. Off. Agr. Chem. **31**, 663 (1948). — *C. O. Willits* und *C. L. Ogg*, J. Ass. Off. Agr. Chem. **32**, 561 (1948). — *C. O. Willits* und *C. L. Ogg*, *R. R. Coe*, J. Ass. Off. Agr. Chem. **32**, 118 (1948).

[13] *H. D. Dakin* und *H. W. Dudley*, J. Biol. Chem. **17**, 275 (1914).

[14] *A. Friedrich*, Z. physiol. Chem. **216**, 68 (1933).

[15] *M. Marzadro*, Ann. chim. appl. **35**, 231 (1945).

[16] *W. Zimmermann*, Mikrochem. **31**, 42 (1943).

[17] *A. A. Morton*, The Chemistry of Heterocyclic Compounds. Mc. Graw-Hill Book Company, New York und London 1946, S. 192.

[18] *C. F. Woodward*, *C. O. Badgett* und *J. G. Kaufman*, Ind. Engng. Chem. **36**, 544 (1944).

[19] *F. Pregl*, Quantitative organische Mikroanalyse, 4. Aufl., Springer-Verlag Berlin, 1935, S. 109.

[20] Loc. cit. (19), S. 106.

Department of Chemistry, The University, Birmingham, England.

The Micro-determination of Carbon and Hydrogen in Fluorine-containing Organic Compounds.

By

R. Belcher and R. Goulden.

With 4 Figures.

(Received July 18, 1950.)

Introduction.

There is little information in the literature regarding the simultaneous determination of carbon and hydrogen in fluorine-containing organic compounds despite the increasing importance of such compounds. As early as 1890, a method for the analysis of benzoyl fluoride was suggested by *Guenez*[1], who burned the sample in a copper tube containing copper oxide and lead chromate. Later, *Morgan* and *Tunstall*[2], working in this Department, employed a combustion tube packed with a mixture of copper oxide and lead chromate followed by a 10 cm length of lead dioxide to trap the volatile fluorine compounds. The method was restricted however, to the analysis of boron trifluoride β-diketone complexes. More recently, *Nikolaev*[3] used a similar packing to effect combustion, and passed the combustion products first through concentrated sulphuric acid to remove water, then through granular potassium fluoride to remove silicon tetrafluoride, and finally through soda-asbestos to remove carbon dioxide.

The use of the conventional *Pregl* method with no modifications other than the employment of a higher working temperature and absorption of the fluorine-containing products in lead chromate at 800° C, has been suggested by various investigators[4]. Certain other procedures have been described which do not, however, determine carbon and hydrogen simultaneously. Either hydrogen alone is determined[5, 6], or carbon simultaneously with fluorine[7] and other halogens[8].

Since it was considered that the *Friedrich* procedure for the micro-determination of carbon and hydrogen was more convenient than that of *Pregl*, and because of the marked attack of lead chromate on silica

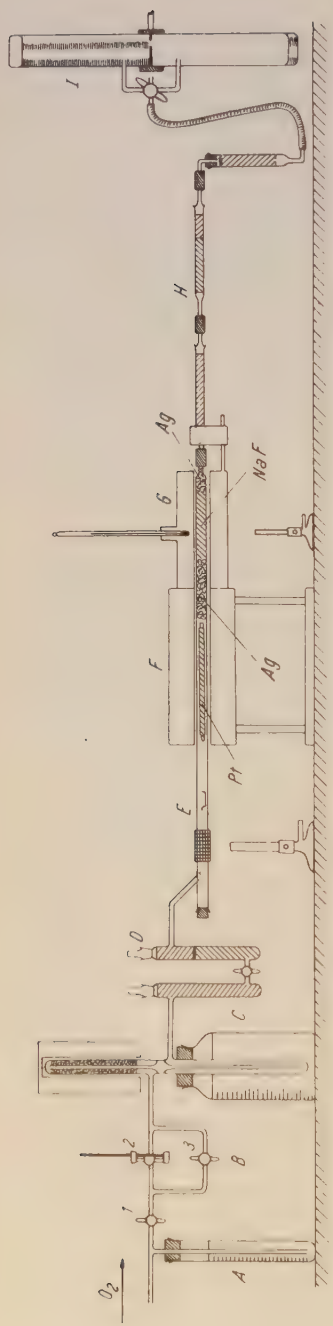


Fig. 1. Line Diagram of Apparatus.

A = Pressure Head, *B* = Three Tap Control, *C* = Pre-heater, *D* = Scavenging Tube, *E* = Combustion Tube, *F* = 750° C Furnace, *G* = 270° C Furnace, *H* = Absorption Train, *I* = Reversible Aspirator Bottle.

combustion tubes at high temperatures, an attempt was made to develop a method based on catalytic combustion and absorption of fluorine-containing decomposition products by heated silver and sodium fluoride.

From the work of *Yatlov* and *Ruiss*[9,10] it appeared that the efficiency of sodium fluoride for absorption of silicon tetrafluoride increased rapidly with temperature to a maximum at about 260° C, regeneration of the used reagent starting at about 315° C. For absorption of hydrogen fluoride, on the other hand, *Froning*[11] indicated that the efficiency of this reagent was high at 25° C, falling off with rise of temperature.

After preliminary experiments in which the conventional *Friedrich* apparatus was used, the combustion train described below was evolved, the sodium fluoride absorbent being tested at a series of temperatures in order to find its optimum working temperature under the conditions of the combustion.

Apparatus.

The apparatus, a line-diagram of which is to be seen in Figure 1, comprised the following items:

Pressure head, three-tap control, pre-heater, scavenging "U" tube, combustion tube in a two-part furnace, absorption and guard tubes, and finally, reversible aspirator bottle.

The train, as will be seen in the plan-diagram in Figure 2, was actually doubled back on itself in order to save space. The details of the items listed are given below:

Pressure head.

A simple "T" piece unit containing a 6″ head of 80% (*v/v*) sulphuric acid, thus giving a positive pressure head equivalent to about 11″ of water.

Three-tap control.

Tap 1, which is located at the very beginning of the system, is for cutting off the oxygen flow from the whole of the train, in order to test for leaks.

Tap 2, to which can be fitted a tap-controlling clamp, is designed to replace the customary *Pregl* precision screw clip. Thus the use of a length

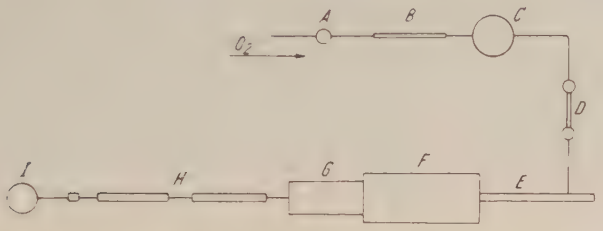


Fig. 2. Plan Diagram of Apparatus.
A = Pressure Head, *B* = Three Tap Control, *C* = Pre-heater, *D* = Scavenging Tube, *E* = Combustion Tube, *F* = 750° C Furnace, *G* = 270° C Furnace, *H* = Absorption Train, *I* = Reversible Aspirator Bottle.

of rubber tubing with its attendant hysteresis effects, is avoided. If desired, a 0–5 ml per minute flowmeter may be inserted immediately behind tap 2.

Tap 3 is a by-pass tap which can be opened fully to give a fast flow of oxygen into the combustion tube when the latter is opened for admission of the sample. This flushing out—which can be effected without disturbing the fine (4 ml per minute) setting of tap 2—thus prevents ingress of moist air into the combustion tube. [Air at room temperature and 50% relative humidity contains about 10 γ of water per ml.]

Pre-heater.

The pre-heater is of the normal *White-Wright*[12] type. The furnace consists of a core of opaque silica tubing (length 160 mm, bore 15 mm and wall thickness 2 mm) wound along its entire length with resistance wire which is held in place by a coating of asbestos cement. The core is fixed centrally in a cylindrical asbestos casing (outside diameter 50 mm, wall thickness 5 mm) and is fitted with asbestos discs, top and bottom. Upon switching on the current, the furnace reaches its equilibrium temperature of ca. 550° C in 30 minutes.

Scavenging tube.

This is a glass-stoppered "U" tube, the two limbs of which are separated by a stopcock. The first limb is filled with Anhydrone granules and the second is filled two thirds full with Carbosorb granules and the remainder with Anhydrone. Cotton wool is used for separating the absorbents and for holding them in position, and the glass stoppers are sealed in with *Krönig* cement.

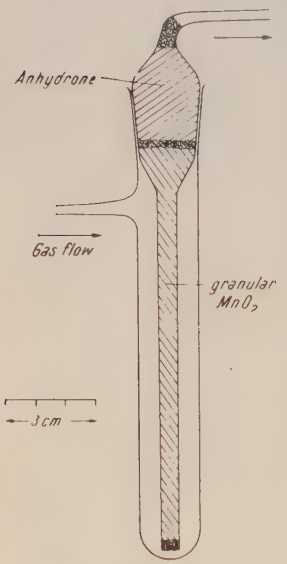


Fig. 3. Manganese Dioxide Tube.

Combustion tube.

The transparent silica combustion tube used is ca. 58 mm long, 9 mm bore, and has a side arm of 3 mm bore.

The beak-end of the tube as well as the last 20 mm are filled with silver wool, the purpose of which is to prevent water condensation. Next to this comes a 60 mm length of granular sodium fluoride. This is prepared by adding distilled water to sodium fluoride powder to give a stiff paste which is baked at 110° C. This gives a cake of the material which, on cooling, can be crushed and sieved, the portion lying between ca. 10–14 mesh being used.

Immediately in front of the sodium fluoride lies a 50 mm length of silver wool for the removal of sulphur and halogen compounds, including the fluorine from any hydrogen fluoride produced. In front of the silver there is a 140 mm long platinum contact, which is made by loosely rolling a $120 \times 50 \times 0{,}08$ mm sheet of the metal across its diagonal. The contact is fitted with platinum wire hooks to facilitate its removal from the combustion tube for cleaning. The combustion tube itself is fitted in the furnace so that 20 mm of the 30 mm long beak-end projects from its end.

Two-Part Furnace.

The primary furnace is electrically heated to 750° ± 20° C by resistance wire wound onto an opaque silica tube core (length 190 mm, bore 15 mm and wall thickness 2 mm). As for the pre-heater furnace, the windings are coated with asbestos cement and the whole is encased in a 50 mm diameter cylindrical asbestos casing. About 45 minutes are needed for this furnace to reach its equilibrium temperature.

The secondary furnace consists of an aluminium block 100 mm in length and 40 mm in diameter, attached to the primary furnace, and

having a 12 mm bore central hole for the combustion tube. The temperature of this part of the furnace is maintained at 270° ± 20° C by a small gas burner; and is measured by a 0–360° C thermometer, the bulb of which is located near the central hole.

An aluminium rod fitted with a small sliding block projects from the secondary furnace, for keeping the beginning of the Anhydrone tube above ca. 50° C and so preventing the condensation of water vapour in the capillary.

Absorption Tubes and Guard Tube.

These are of the normal *Pregl* type, the fillings being kept in place by small wads of cotton wool. Where nitrogen-containing compounds are to be analysed, manganese dioxide, the external absorbent for nitrogen oxides recommended by *Belcher* and *Ingram*[13], is interposed between the Anhydrone and Carbosorb tubes. A suitable design for the manganese dioxide tube is given in Figure 3.

Reversible Aspirator Bottle.

This aspirator bottle, which is shown in Figure 4, has been developed from the one suggested by *Fischer*[14]. It is considered to be an improvement in that it is more compact, can be held centrally by a single-jaw clamp for rotating, and does not require the removal between determinations, of the rubber tubing connecting it to the guard tube. The bottle is readily calibrated by the admission of known volumes of water.

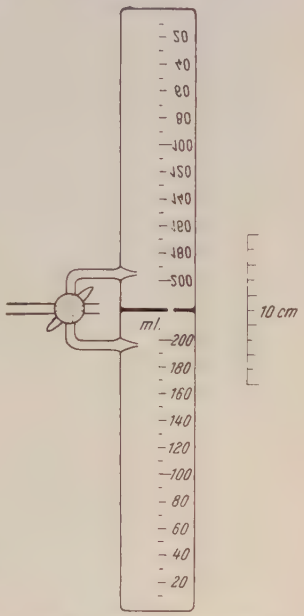


Fig. 4. Reversible Aspirator Bottle.

Procedure.

When the furnaces are at equilibrium, connect up the whole apparatus. With taps 1, 2 and 3 closed, open the needle valve of the oxygen cylinder until oxygen bubbles out from the pressure head at a rate of about 2–5 bubbles per second. Invert the aspirator bottle so that the water is in the upper chamber and turn the tap so that the oxygen can enter this chamber.

Open tap 1 fully and carefully adjust tap 2 using the controlling clamp, until the bubble rate in the aspirator bottle indicates that the oxygen flow is 4 ml per minute. Remove, wipe and weigh the two absorption tubes using the customary procedure of *Pregl*—weighing

the perchlorate tube on the 10th minute and the soda-asbestos tube on the 15th.

Weigh 3–5 mg of the dried sample into a platinum boat. Connect the absorption tubes, open tap 3 and remove the bung from the combustion tube. The oxygen flowing out from the pressure head should now be 1 bubble per second or less. Quickly insert the sample to within 80 mm of the primary furnace and replace the bung. Shut tap 3 and close the reducing valve of the oxygen cylinder so that the oxygen flowing out from the pressure head is still below 1 bubble per second.

Test for leaks by shutting tap 1. The bubbling in the aspirator bottle should cease in a few seconds. Open tap 1 and re-adjust the flow (if necessary) to 4 ml per minute, using tap 2. Note the time and start the first run with the burner. A 50 mm long roll of brass or nickel gauze or sheet kept above the burner, ensures even heating of the tube.

The first run is completed in 15 minutes, and the second in 5 minutes, the volumes of oxygen collected in the bottle being 60 ml and 20 ml respectively. Sweep out the combustion tube for 20 minutes, so that the total volume of oxygen passed in the determination is 180 ml. Remove the absorption tubes and repeat the timed wiping and weighing procedure.

Results.

Table 1. Indication of Precision.

Results for ten repeat determinations on a specially purified sample of monofluorobenzoic acid (fluorine content 13,56%).

% Element	Theory	Actual Mean	Mean Deviation	Std. Deviation
Hydrogen ..	3,60	3,59	± 0,07	± 0,08
Carbon	60,01	59,94	± 0,16	± 0,19

Discussion.

Mechanism of Decomposition.

From observations made during the development of the method, some idea of the possible mechanism of the decomposition reactions may be suggested.

When fluorine-containing compounds are first heated, hydrogen fluoride is produced which attacks the combustion tube in the vicinity of the platinum boat, giving rise to the formation of silicon tetrafluoride. On passing through the furnace maintained at 750° C, some of this silicon tetrafluoride is decomposed, producing hydrogen fluoride again, and leaving an opaque powdery deposit of silica clinging to the platinum

contact and to the walls of the combustion tube around it. This breakdown is to be expected, since the reaction

$$4\,HF + SiO_2 \rightarrow SiF_4 + 2\,H_2O$$

is exothermic, heating of the silicon tetrafluoride tending to promote the reverse reaction.

Because of the silica deposit on it, the platinum contact needs cleaning every twenty determinations or so. This is best done by immersion in cold concentrated hydrofluoric acid solution contained in a long waxed test-tube, followed by washing with distilled water and ignition to red-heat.

The hydrogen fluoride produced by the decomposition of the silicon tetrafluoride, reacts with the heated silver wool at the end of the 750° C furnace giving rise to silver fluoride, the hydrogen being reconverted to water vapour. The silver fluoride (m. p. 435° C) is driven along by the heat to the junction of the primary and secondary furnaces, where it produces a yellow ring on the inside of the combustion tube.

The undecomposed silicon tetrafluoride passes on to be absorbed by the sodium fluoride in the secondary furnace, and all of the hydrogen of the organic compound leaves the combustion tube as water vapour.

Sodium Fluoride Temperature-Efficiency Relationship.

The efficiency of the sodium fluoride as an absorbent for silicon tetrafluoride has been studied at varying temperatures between 110° and 350° C. For compounds of relatively low fluorine content (below ca. 15–20%), a temperature as low as 110° C was sufficient. As the fluorine content of the compound increased, so did the temperature needed to get quantitative absorption of silicon tetrafluoride. This agrees with the work of *Yatlov* and *Ruiss*[9] who showed that the reaction rate of silicon tetrafluoride with sodium fluoride increased markedly up to 260° C.

When the sodium fluoride was heated to 350° C, high carbon values together with the characteristic dark-brown zone of silicon tetrafluoride in the Carbosorb tube, indicated that the back reaction

$$Na_2SiF_6 \rightarrow 2\,NaF + SiF_4$$

was taking place. Satisfactory results were however, obtained using the sodium fluoride at 300° C, but since this is rather close to the temperature (315° C) at which regeneration of the sodium fluosilicate is said[9] to begin, it is recommended that 270° C be considered the optimum temperature for general working.

Life of Combustion Tube and Filling.

Despite the attack by hydrogen fluoride, the silica combustion tube should last for 200–300 determinations or more. The life of the silver

wool is similarly great, unless large numbers of halogen- or sulphur-containing compounds are being analysed. The sodium fluoride filling should last for about 100 determinations and pick up around 200 mg of silicon tetrafluoride before becoming exhausted.

Range of Compounds Analysed.

As can be seen from Table 2 (a), compounds containing the elements C, H, O, F; C, H, F, and C, H, Cl, F can be analysed quite satisfactorily by this method. A few nitrogen-containing compounds [see Table 2 (b)], have likewise been analysed successfully, the nitrogen oxides produced being absorbed in a manganese dioxide tube placed after the Anhydrone tube.

Table 2. Typical Compounds Analysed.

(a) *Non-nitrogenous.*

Compound	Theoretical Results			Results Obtained	
	% F	% H	% C	% H	% C
Difluoro diphenyl trichloroethane	11,8	2,8	52,3	3,1	52,2
4:6-Benzylidene monoacetyl mono trifluoroacetyl α-methyl glucoside	13,6	4,6	51,5	4,8	51,6
4:6-Benzylidene mono trifluoroacetyl α-methyl glucoside	15,1	4,5	50,8	4,6	50,4
Difluorobenzophenone	17,4	3,7	71,6	3,7	71,6
				3,7	71,7
1:2-Diphenyltetrafluoroethane	29,9	4,0	66,1	4,1	66,3
				4,0	65,9
3:Trifluoromethyl benzoic acid	32,0	2,6	50,3	2,8	50,4
Trifluoromethyl lactic acid	36,1	3,2	30,4	3,2	30,4
				3,2	30,4
				3,3	30,6
Mannitol hexa-trifluoroacetate	45,2	1,1	28,5	1,1	28,3
				1,2	28,3
Trifluoroacetone polymer	50,8	2,7	32,2	2,8	32,2
				2,6	32,1

(b) *Nitrogenous.*

Compound	Theoretical Results			Results Obtained	
	% F	% H	% C	% H	% C
N-Trifluoroacetyl β-naphthylamine	23,8	3,4	60,2	3,2	60,6
N-Trifluoroacetyl cyclohexylamine	29,2	6,2	49,2	6,2	49,6
Trifluoroacetanilide	30,2	3,2	50,8	3,2	50,8
Di-trifluoromethyl azobenzene	35,8	2,5	52,8	2,7	53,1
				2,8	53,0
				2,6	52,9

Some preliminary work has been done on the determination of the fluorocarbons, i.e. the $C_x F_y$ type of compound. In straightforward tests, the results given for carbon were 1-2% lower than the theoretical. Since it was believed that the series of decomposition reactions started with the formation of hydrogen fluoride, it was thought that the absence of hydrogen was the cause of these low results. Hydrogen was accordingly supplied by burning the fluorocarbons mixed with a weighed amount of benzoic acid in the platinum boat. After correcting the results for the amount of carbon dioxide produced by the benzoic acid, it was found that the correct carbon values were obtained for the fluorocarbons. Two other ways in which hydrogen may be supplied, which are being considered, are:

(1) As water—in a second boat placed near the mouth of the combustion tube.

(2) As water—from a water bubbler in the train.

It has been said in the literature[15] that the fluorocarbons are characterised by their great thermal stability. This has not been found to be the case with the few compounds of this type which have been tested here. It may be, however, that the presence of small amounts of hydrogen in these fluorocarbons (perhaps due to their not being absolutely fully fluorinated) is responsible for their relatively easy breakdown on heating, and that were all traces of hydrogen absent from both the compound and oxygen used, decomposition would be difficult.

Summary.

The sample is burned in a silica combustion tube, using a 4 ml per minute oxygen stream. Oxidation of the combustion products is completed by passing them over a platinum contact heated to 750° C, after the manner of *Friedrich*. Silver wool at the same temperature removes sulphur and halogens, including the fluorine from any hydrogen fluoride produced, and granular sodium fluoride at about 270° C is used to absorb silicon tetrafluoride.

The water vapour and carbon dioxide are determined in the usual way by absorption in magnesium perchlorate and soda-asbestos respectively. Satisfactory results have been obtained for the analyses of 4 mg samples of compounds containing the elements C, H, O, F, the standard deviation of the results for hydrogen being about $\pm$ 0,1% H and for carbon being about $\pm$ 0,2% C.

Preliminary work indicates that fluorocarbons may be analysed if water-vapour is introduced into the system, and that the presence of nitrogen in compounds presents no difficulty when an external absorbent for nitrogen oxides is used. Certain refinements are included, which are applicable to the conventional apparatus for micro carbon and hydrogen determination.

Zusammenfassung.

Zur Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff in fluorhaltigen organischen Verbindungen wird die Substanz in einem Quarzverbrennungsrohr im Sauerstoffstrom von 4 ml/Minute verbrannt. Die vollständige Oxydation der Verbrennungsprodukte erfolgt nach *Friedrich* durch Überleiten über einen Platinkontakt bei 750° C. Bei derselben Temperatur hält Silberwolle Schwefel und alle Halogene einschließlich Fluor zurück, soweit es als Fluorwasserstoff vorliegt. Zur Absorption von Siliciumtetrafluorid wird gekörntes Natriumfluorid bei etwa 270° C verwendet.

Wasserdampf und Kohlendioxyd werden in der üblichen Weise mittels Magnesiumperchlorat bzw. Natronasbest bestimmt. Bei Einwaagen von 4 mg Substanz irgendeiner Verbindung der Elemente C, H, O und F werden befriedigende Ergebnisse erhalten. Die durchschnittlichen Abweichungen von der Theorie betragen für Wasserstoff etwa $\pm$ 0,1%, bei Kohlenstoff etwa $\pm$ 0,2%.

Vorversuche haben gezeigt, daß fluorhältige Kohlenwasserstoffe bei gleichzeitiger Zufuhr von Wasserdampf in die Apparatur analysiert werden können und daß die Gegenwart von Stickstoff in der Analysensubstanz keine Schwierigkeiten mit sich bringt, wenn ein zusätzliches Absorptionsmittel für Stickstoffoxyde vorgesehen ist. Einige Verbesserungen der herkömmlichen Apparatur für die Mikro-C-H-Bestimmung werden angeführt.

Résumé.

L'échantillon est brûlé dans un tube à combustion en silice, utilisant un débit d'oxygène de 4 ml par minute. L'oxydation des produits de combustion se complète en les faisant passer sur un contact de platine chauffé à 750° C d'après le procédé de *Friedrich*. La laine d'argent à la même température élimine le soufre et les halogènes y compris le fluor de tout fluorure produit et le fluorure de sodium granulaire à 270° environ sert à absorber le tétrafluorure de silicium.

La vapeur d'eau et le gaz carbonique sont dosés comme d'habitude par absorption sur le perchlorate de magnésium et l'amiante sodé respectivement. Des résultats satisfaisants ont été obtenus pour les analyses de 4 mg d'échantillons de composés contenant les éléments C, H, O, F: l'erreur moyenne des résultats pour l'hydrogène étant $\pm$ 0,1% H et pour le carbone, environ $\pm$ 0,2% C.

Un travail préliminaire indique que les hydrocarbures fluorés peuvent être analysés si l'on introduit de la vapeur d'eau dans le système et que la présence d'azote dans les composés ne présente pas de difficulté quand on utilise un absorbant extérieur pour les oxydes de l'azote. Certaines améliorations applicables à l'appareil classique pour les microdosages de carbone et d'hydrogène sont incluses.

Discussion.

Mr. *Huber* (Spiez, Switzerland): Hat Herr *Belcher* Erfahrung in der C-H-Bestimmung bei Verbindungen, die neben Fluor auch Phosphor enthalten?

Mr. *Belcher*: Nein.

Mr. *Kirsten* (Uppsala, Sweden): Mr. *Belcher* has described a rapid combustion method using the unpacked tube. In the present lecture he reports on the use of a tube containing platinum contact. Why has Mr. *Belcher* not applied the empty-tube method in the present investigation?

Mr. *Belcher*: Because we were dealing with an entirely new type of compound it was simpler to start with a slow combustion procedure. Moreover, since no method had been published in recent years describing the determination of carbon and hydrogen in fluorine-containing compounds, we prefered to develop a method for which readily available apparatus could be used rather than the specialised apparatus used in the rapid combustion procedure. A greater number of workers could then adopt the method. At a later date we shall attempt to use the rapid method for the analysis of fluorine-containing compounds.

References.

[1] *E. Guenez*, C. r. acad. sci., Paris **111**, 681 (1890).

[2] *G. T. Morgan* and *R. B. Tunstall*, J. Chem. Soc. London **125**, 1963 (1924).

[3] *N. S. Nikolaev*, Bull. acad. sci. U. S. S. R. Classe sci. chim. **1945**, 309; Chem. Age **54**, 309 (1946).

[4] Private communications from three industrial laboratories.

[5] *W. H. Pearlson* et al., Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **18**, 330 (1946).

[6] *J. F. Miller* et al., Analyt. Chemistry **19**, 146 (1947).

[7] *J. H. Simons* et al., J. Amer. Chem. Soc. **61**, 2962 (1939).

[8] *R. O. Teston* et al., Analyt. Chemistry **19**, 193 (1947).

[9] *V. S. Yatlov* and *I. G. Ruiss*, J. Applied Chem. U. S. S. R. **5**, 332 (1932).

[10] *V. S. Yatlov*, Russ. Patent 30268, July 31st 1933.

[11] *J. F. Froning* et al., Ind. Engng. Chem. **39**, 275 (1947).

[12] *E. V. White* and *G. F. Wright*, Canad. J. Res., Sect. B **14**, 427 (1936).

[13] *R. Belcher* and *G. Ingram*, Analyt. Chim. Acta **4**, 401 (1950).

[14] *F. O. Fischer*, Analyt. Chemistry **21**, 827 (1949).

[15] *J. H. Simons*, Ind. Engng. Chem. **39**, 238 (1947).

From Courtaulds, Limited, Research Laboratory, Maidenhead, Berks.

Rapid Micro Combustion Methods for the Determination of Elements in Organic Compounds.

By

G. Ingram.

With 5 Figures.

(Received June 14, 1950.)

Introduction.

During the last decade a number of modifications of standard methods of combustion analysis aimed at simplifying the methods and reducing their inherent sources of error has been proposed. The most important of these developments is perhaps the rapid combustion technique advanced by *Belcher* and his collaborators, whereby combustion of the sample may be effected in 10 to 15 minutes, by increasing the flow of oxygen tenfold and conducting the combustion in an empty tube maintained at 800° C.

This new technique was developed for the macroanalysis of various types of industrial organic materials[1] and was later adapted to the microanalysis of organic compounds by *Belcher* and *Spooner*[2]. In comparison with *Pregl*'s combustion technique or any of its modifications, this "empty tube" process requires the simplest of apparatus and the minimum of manipulation. But it has yet to be established whether or not the conditions of combustion will prove applicable for the analysis of all types of organic compounds. In view of this a thorough investigation has been made to ascertain the capabilities of rapid combustion when applied to the micro determination of carbon and hydrogen, sulphur, and the halogens. Part of this work has already been published elsewhere[4, 7] but certain observations and experimental work remain to be reported.

Briefly, rapid combustion technique consists of conducting the gradual vaporization of the sample into the hot combustion zone of the tube by means of a movable gas burner, using an oxygen flow rate of 50 ml

per minute. In the carbon and hydrogen method, halogens and sulphur present are removed by heated silver placed at the beak end of the zone where the temperature is considerably less than 800° C. Nitrogen oxides are removed externally by an absorbent placed in between the water and carbon dioxide absorption tubes. Sulphur can be estimated simultaneously[2] by a determination of the increase in the weight of the silver after its removal from the combustion tube. Sulphur in the presence of halogen can also be estimated gravimetrically in this way by extraction of the silver sulphate with water. Alternatively, these elements may be determined in the usual conventional manner after absorption of the combustion products in a suitable absorber attached to the exit of the combustion tube.

The Determination of Carbon and Hydrogen.

In any combustion method, particularly in the determination of carbon and hydrogen the question arises as to which procedure offers the best conditions for the complete conversion of the sample into its combustion products. In the standard method one relies on the presence of a small excess of oxygen plus either a catalytic surface such as platinum, or an oxidant such as copper oxide, to convert all the carbon and hydrogen of the sample into carbon dioxide and water. Under such conditions the rate of combustion is a critical factor of the determination. Careful control of the combustion is essential to maintain a steady influx of vapour into the combustion zone. If this is allowed to proceed too rapidly one of two things can occur which will ultimately effect the result. A large increase in pressure may be set up in the combustion tube with the result that the flow of oxygen through the tube is hindered by the capillary constriction of the choking plug. In addition, some of the unburnt vapour may be forced back behind the sample boat towards the mouth of the tube. Alternatively, some incompletely burned substance may pass the choking plug on account of the sudden expansion of gases and the suction effect of the Mariotte bottle. Although the combustion stage of the procedure has been to some extent facilitated by means of automatic control, such a course is by no means universally applicable when dealing with compounds which differ widely in their structure. No two types of organic compound combust alike, and even with the semi-automatic system advocated by *Clark* and *Stillson*[3] it is doubtful whether in its present form such a course is more advantageous than manual control of the combustion.

With manual control, using a gas burner moved by hand, the combustion apparatus is simpler, the substance is under constant observation, and the temperature can be regulated much more conveniently.

In the rapid method quantitative conversion of the organic substance into carbon dioxide and water is solely dependent on the large excess of oxygen streaming through the tube, and to a lesser degree on the temperature of the combustion zone. Under these conditions the rate of burning is not so critical since sufficient oxygen is always available and the dimensions of the combustion zone can be altered at will to allow adequate mixing of the combustion products with oxygen.

We have then to sum up, two forms of combustion procedure. In one, complete combustion can only take place by the slow continuous vaporization of the sample so that the gases evolved have a certain

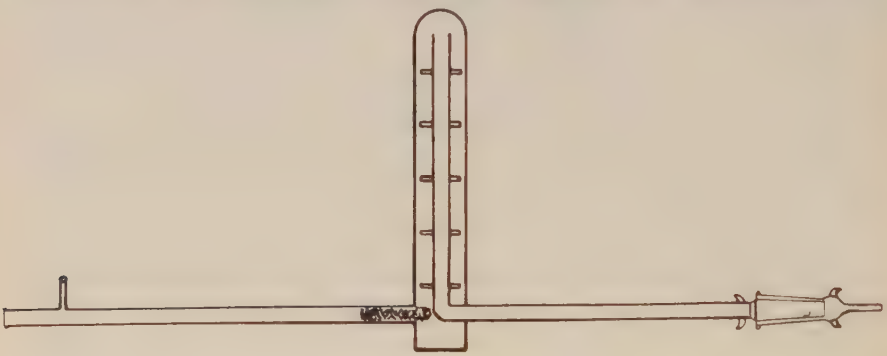


Fig. 1. Combustion tube for the Carbon and Hydrogen estimation.

period of contact with the hot filling in the combustion tube. This condition is governed by the use of a constant gas-speed of 4 ml per minute under a 50 to 80 mm heat of water, which in turn, is governed by the efficiency of the choking plug, and the skill of the operator. In the second method where combustion of the sample is effected in an empty tube with a gas-speed of 50 ml per minute, combustion can be ensured because the simplicity of the apparatus allows greater scope in altering the dimensions or design of the combustion tube to fulfil the one important condition, namely, a combustion zone sufficiently large enough to procure complete conversion of the gases streaming through it into carbon dioxide and water.

The combustion tube[4] shown in Figure 1 has been developed for this purpose, since in a recent examination of the *Belcher* and *Spooner* method it was found that while most types of organic compounds could be analysed satisfactorily with a combustion zone length of 25 cm, volatile and explosive compounds in particular could not be analysed successfully[5]. In addition certain research samples were also difficult to combust properly. Fine particles of carbon were formed with some hydrocarbons and substances containing large numbers of carbon atoms

in the molecule, even when the temperature of the zone was raised to 1000° C. The fine particles were swept through the combustion zone and deposited in the beak of the tube. It was eventually found that this source of error could be prevented by placing a plug of quartz wool 4 to 5 cm long, at the front end of the zone which completely retained the carbon particles so that the deposit could be burned away completely with the movable burner. In a number of cases the rapid method has given results approaching the theoretical values with research compounds which could not be analysed satisfactorily by the standard method or one of its modifications.

Whilst the success so far obtained with the method has shown that for routine purposes its accuracy is comparable with that of the standard method, it is by no means certain yet that the combustion apparatus in its present form will cope with all known types of organic compounds. Some indication that the present conditions are not universally suitable was obtained recently when thermally stable substances were combusted. Although a satisfactory analysis was obtained with a sample of chlorinated diphenyl with the standard method, low results were obtained when the sample was combusted under rapid combustion conditions. The sample sublimed from the boat along the tube in a solid band in front of the movable burner, and when the hot zone was reached all the sample was driven into the combustion chamber at once with the result that a small percentage of it was swept through the chamber and deposited in the cool beak. Although diphenyl itself could be analysed satisfactorily, the chlorinated sample could only be analysed by altering the conditions of the combustion. The temperature of the hot zone had to be increased to 1000° C, and the quartz plug replaced by one of platinized asbestos. This form of plug is not a recommended modification for normal usage, since its presence in the combustion zone increases the yield of nitrogen oxides when the sample contains nitrogen.

Discussion of the Possible Sources of Error.

Now that considerable experience has been obtained with the rapid combustion method and with the type of apparatus constructed, it is possible now to discuss inherent sources of error. With the form of apparatus shown in Figure 2, possible sources of error are fewer than those experienced with the standard method.

Obviously the most important one is incomplete combustion, but this should never occur if the combustion of the sample is carried out in a proper manner. Because the method is essentially a rapid one it must not be assumed that the term "rapid" must be taken literally, and the sample combusted simply by placing the flame of the movable burner underneath the boat containing the sample. The gradual rather

than rapid combustion of the sample is desirable so that the vaporized material enters the combustion chamber in a continuous stream over a period of not less than 6 minutes. The combustion of benzoic acid is a good example of the proper technique to adopt.

A variation in oxygen flow from its pre-arranged setting during a combustion constitutes a source of error, for a change in pressure in either direction will result in a low carbon figure. As yet it is not clear why a change in pressure should affect the combustion in this way. With an oxygen flow rate of 50 ml per minute, the figure which appears

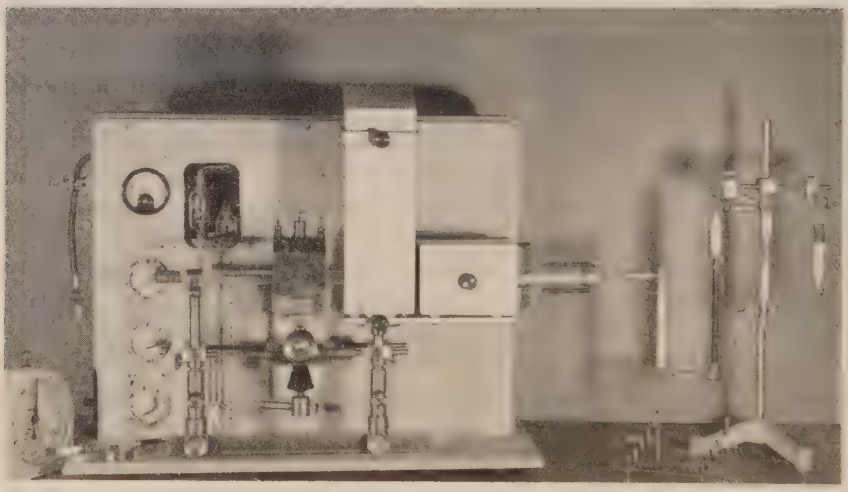


Fig. 2. Combustion apparatus for the Carbon and Hydrogen estimation.

to be most satisfactory for rapid combustion methods, a change of about 20% during a combustion gave low carbon figures which varied between 0,5 to 1,0% below their theoretical values. When a *Pregl* type of pressure regulator was inserted before the flow-meter, this source of error was completely eliminated.

Another possible source of error arises from the pressure changes in the absorption tubes, brought about by their removal from a system through which a fast gas stream has been flowing. An exact procedure for their removal after a combustion is essential. An alteration from a high pressure condition created by the fast gas flow, to one approaching atmospheric pressure disturbs the equilibrium of the entire system and causes fluctuations in the weights of the absorption tubes.

Blank tests carried out with *Flaschenträger* type of tubes showed that values not exceeding $\pm$ 0,050 mg for water and $\pm$ 0,020 mg for

carbon dioxide were only obtained when the gas-speed was reduced to a flow rate of about 4 ml per minute, one minute before the outlet tap of the carbon dioxide tube was closed in preparation for their subsequent removal. The correct procedure for their removal consists of leaving the tubes in position with the outlet tap of the carbon dioxide tube closed for one minute before the remaining three taps of the two absorption tubes are closed. After their detachment and wiping, each inlet tap should be opened momentary to release any pressure set up before the tubes are placed in the balance for weighing.

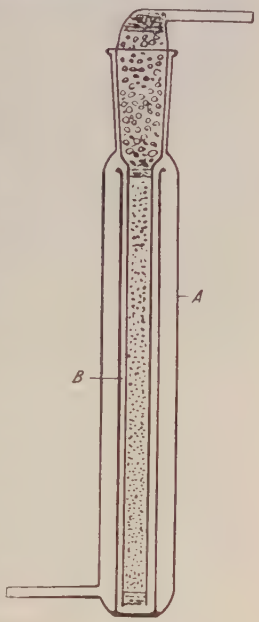


Fig. 3. Nitrogen oxide absorber.

Errors Connected with Nitrogen Oxide Removal.

One of the main sources of error in the standard method is attributable to the lead dioxide used for the removal of nitrogen oxides produced from combustion of nitrogen containing substances. For this reason, and because the use of lead dioxide in the rapid method introduces the need for a heating mortar, the external removal of nitrogen oxides was preferred.

The liquid absorbents recommended by *Elving* and *McElroy*[6] for the standard method are also satisfactory under rapid combustion conditions, but have one failing in that they soon become exhausted and must be replaced after two or three analyses. A search for a more efficient reagent has revealed that granules of manganese dioxide remove nitrogen dioxide efficiently at room temperatures[7]. One filling contained in the absorber shown in Figure 3 will remain effective for at least 50 combustions.

In many respects the new reagent resembles lead dioxide. Many commercial preparations are of an alkaline nature and will absorb carbon dioxide, even after treatment by digestion with hot dilute sulphuric acid solution. Those preparations having a brownish colour are prone to this behaviour, and only a product having a black colour is suitable for micro combustion work.

The bubbler type of absorber is an essential feature of the apparatus, for earlier work using the reagent showed that though nitrogen dioxide absorption is a quantitative function, under combustion conditions with a U-tube type of absorber, the reagent fails and errors arise from absorption of nitrogen oxides in the carbon dioxide absorption tube. The same applies when the U-tube type of absorber is used for the reagent in the standard combustion method.

Presumably this failing is not due to the inability of the manganese dioxide to cope with varying concentrations of nitrogen dioxide, but to its inability to take up nitric oxide, which is one of the products formed under rapid combustion conditions. With a combustion zone of 900° C, the temperature finally selected, and with a gas-speed of 50 ml per minute, there is no guarantee that nitrogen dioxide is the only oxide of nitrogen formed. At 620° C nitrogen dioxide dissociates completely into nitric oxide and oxygen, and at lower temperatures their recombination is known to proceed only slowly in dilute mixtures, particularly when dry. Under these conditions, and with the reagent packed into a U-tube, the mixture of nitrogen oxides is swept through the water absorption tube into the reagent container too quickly for the nitric oxide to recombine again with oxygen. Some nitric oxide therefore passes through the nitrogen oxide absorber to recombine with oxygen prior to the carbon dioxide absorption tube where the recombined gas is retained by the alkaline absorbent used.

This theory was further substantiated during experiments carried out to determine the extent to which nitrogen oxides are formed by the rapid combustion of nitrogen containing compounds under the conditions described. In these experiments lower yields of nitrogen dioxide were obtained when the gas was collected in a tared absorption tube containing manganese dioxide granules than when a cooling chamber was connected before the tared tube. The results of this work will be reported at a later date.

Earlier users of external absorbents have not obtained high carbon figures because the reagents they used were liquids, and being contained in bubblers, effectively mixed the gases bubbling through the solution. A similar effect is obtained with the type of absorber illustrated (Figure 3). The chamber "A" greatly increases the path of the gas flow so that the gases have more opportunity of combining prior to passage through the reagent packed into the tube "B".

This effect may well account for the high carbon figures obtained by *Colson*[8] who used a spiral form of combustion tube to obtain a greater length of combustion zone, and a packing of heated lead dioxide at the beak end of the tube to retain nitrogen oxides. He found that satisfactory results with nitrogen containing compounds could only be obtained by inserting a further layer of the heated reagent in between the two absorption tubes.

From time to time it has been reported in the literature that the practice of using an external absorbent for the removal of nitrogen oxides is not an ideal procedure to adopt. It has been claimed by some workers that oxides of nitrogen are retained in the water absorption tube in sufficient amounts to vitiate the hydrogen figure. On the other

hand many others report favourably on its adoption[5, 6, 9, 15]. This controversy indicates that the conditions necessary to prevent absorption are somewhat critical, and it is possible that those who find the procedure satisfactory have accidently adopted the correct conditions.

It has been shown by *Belcher* and *Ingram*[7] that nitrogen oxide retention is negligible in the water absorption tube both in the conventional and rapid methods. Inconsistent hydrogen figures were found to be caused by some retention of nitrogen oxides by the condensed water prior to its absorption by the desiccant. This could be prevented in the conventional method by suitable modification of the combustion tube filling: by warming the beak of the tube, capillaries and bell chamber of the *Pregl* absorption tube, and by using glass wool at the inlet end of the absorber as a packing plug for the desiccant, in place of the classical one of cotton wool.

These precautions were found to be unnecessary in the rapid method because, presumably, the fast gas-stream employed in the determination drives the water vapour well into the desiccant layer before any condensation can take place. Since, however, cotton wool is sufficiently absorbent to retain moisture, its use is undesirable even under these conditions.

The Determination of Sulphur and Halogens.

The advantages of combustion methods over the classical *Pregl-Carius* or *Parr* bomb methods[16] for the determination of the sulphur and halogen content of organic compounds are too well known to be discussed here. Methods based on the combustion principle are numerous, which can be grouped into three classes. Firstly, those methods in which the compound is combusted in a slow stream of oxygen in a tube, and the decomposition products passed over heated platinum catalysts. Secondly, those methods in which the sample is burned in a rapid stream of air or oxygen in a quartz tube at the surface of silica frits, or in a tube devoid of any contact surface. In the third group may be classed those methods of a special nature such as hydrogenation[17] and those employing principles which may only be applied to special compounds. They include lamp methods and vaporization methods whereby the sample is mixed with a combustible gas and ignited at a jet, and the decomposition products collected and the halogen or sulphur contents determined by an established procedure.

Of those methods employing a slow stream of oxygen for the combustion, the method developed by *Pregl*, which is based on *Dennstedt*'s macro method, has found universal application. It has, however, a number of disadvantages which have been largely overcome by the methods developed which employ a fast stream of air or oxygen for the combustion of the sample.

In *Pregl*'s method combustion of the sample must be conducted very slowly in a stream of oxygen not exceeding 4 ml per minute. If the vaporization is allowed to proceed too rapidly, incompletely burned compound passes the heated platinum catalyst, vitiating the result. The method is therefore time consuming.

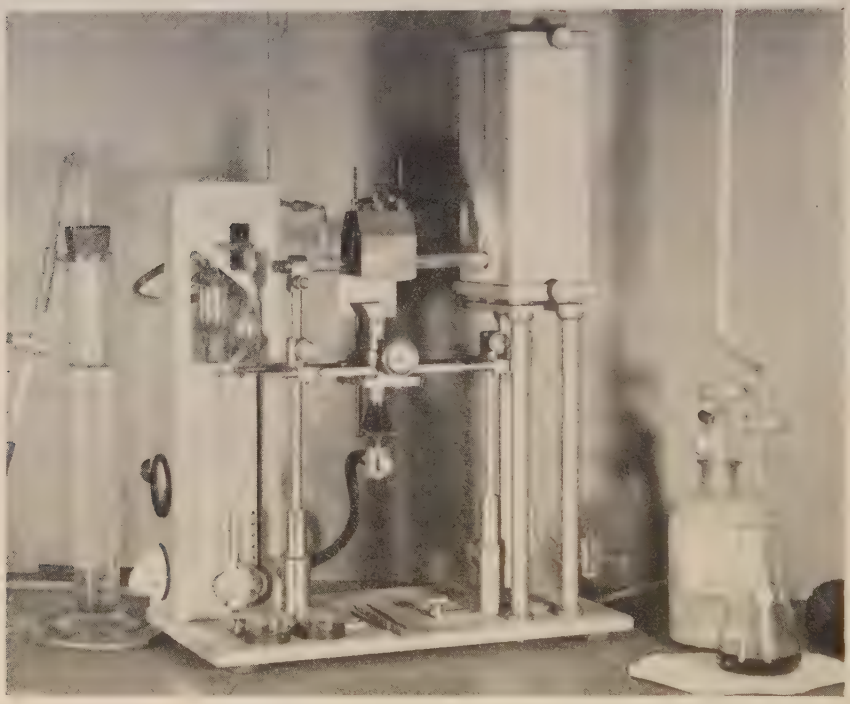


Fig. 4. Combustion apparatus for the determination of sulphur and Halogens.

Another disadvantage arises from the design of the combustion tube. The absorber for the retention of the halogen or sulphur combustion products is sealed in a horizontal position to the tube, so that the analysis is made even more time consuming because the hot zone of the tube must cool before the contents of the absorber can be rinsed out. Although this waiting period has been eliminated by attachment of the absorber to the tube with a ground joint[18] or by the use of a vertical absorber[19, 20] to permit the absorbed combustion products to be washed from the apparatus without removing the tube from the furnace, the first disadvantage is still present.

Methods of the second class are of some interest for they are both simple and rapid in operation. The *Grote* method, later adapted to the

micro scale by *Schöberl*[21], though rapid in operation, suffers from the disadvantage that the ground joint connection of the absorption apparatus must be kept hot at 350° C when sulphur compounds are combusted, in order to prevent condensation of sulphur trioxide or sulphuric acid at that point. In this respect no advantage can be gained by direct sealing of the absorption apparatus to the combustion tube because the absorber must be detached so that the absorbed combustion products may be rinsed out.

It has been shown that in the carbon and hydrogen method[4] the rapid combustion process allows greater scope in altering the design of the combustion tube. This property has been used to advantage in the construction of a combustion apparatus for the determination of sulphur and halogens, based on earlier work of *Belcher* and *Spooner*[2]. This apparatus, which is shown in Figure 4, will be described in greater detail at a later date. The essential feature is the vertical form of combustion tube which is slightly different in construction from the one designed for the determination of carbon and hydrogen. It is constructed of clear quartz (its design is shown diagrammatically in Figure 5) and is free from the disadvantages associated with the other forms of apparatus mentioned.

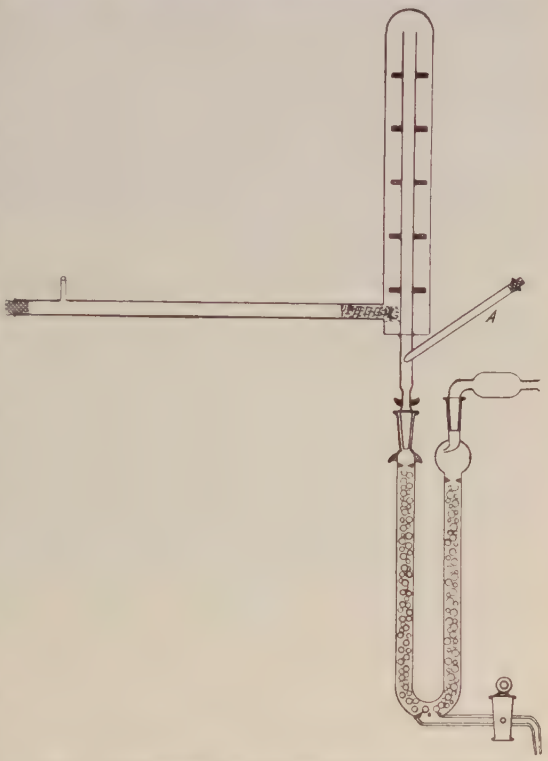


Fig. 5. Combustion tube for the Sulphur and Halogen estimations.

The advantages are that the method is both simple and rapid, since combustion of the sample is effected in an empty tube with an oxygen flow of 50 ml per minute. Sulphur oxidation products which condense in the cooler part of the tube between the furnace and the absorber can be rinsed out conveniently by means of the wash tube "A" (Figure 5). Finally, a detachable type of absorber can be used.

The type of absorber found to be most convenient is that shown in the diagram. It is constructed of chemically resistant glass tubing, filled with 3 mm diameter beads of similar glass, and has a tap situated at the junction of the two limbs to facilitate rinsing out the absorbed combustion products.

The procedures adopted for the determination of the sulphur and halogen contents of the combustion products are those based on previously published titrimetric methods with some modifications. The results of this part of the investigation using volumetric procedures were equal in accuracy to the consuming conventional gravimetric ones.

Procedures for the Determination of Sulphur.

When carbon is the only acid-forming element present besides sulphur, the sulphuric acid formed by absorption of the oxides of sulphur in neutral hydrogen peroxide may be accurately determined by its titration with standard alkali, employing a mixed indicator consisting of 0,1% alcoholic solutions of methyl red and methylene blue. By this means two complete analysis can be carried out in less than one hour. When halogen or nitrogen or both are present, determination of the sulphur is more complicated. The number of methods suggested for such complex mixtures is extensive, most of them being based on methods previously worked out on the macro scale. The simplest of these methods is the direct titration of the sulphur after neutralization of the mixed acids, with standard barium chloride solution using tetrahydroxyquinone or rhodizonic acid indicators. In general, however, the use of these indicators has not proved very successful as indicated by the refinements introduced by *Hallett* and *Kuipers*[22] and others[23] to improve the end point.

Simple evaporation of the volatile acids followed by titration of the residual sulphuric acid[24] is not reliable. Loss of sulphuric acid may occur, caused by ammonia vapour in the air[25] or by creeping of the acid if the evaporation is prolonged[20].

The *Gibson* and *Caulfield* method[26] whereby excess of barium chloride used for the precipitation of sulphate is determined iodometrically or ferrousimetrically[27] after precipitation as barium chromate, may lead to errors. The various errors in this method has been discussed by *Manov* and *Kirk*[28], and *Leithe*[29], who has described similar methods for small amounts of sulphate applies corrections to compensate for filtration losses and the solubility of barium chromate. Likewise, the benzidine method of *Friedrich* and *Mandl*[30] appears to be of very limited application, for chlorides interfere[31] and the working conditions must be carefully controlled to avoid losses through the solubility of the precipitate[22].

The procedure finally adopted when other acid-forming elements are present was that described with slight modification, by the author

a few years ago[20]. This involves a simple acid-alkali titration after removal of the interfering acids by evaporation with a known excess of barium chloride, the unused precipitant being determined by addition of mercuric oxycyanide. The reactions involved are as follows:

$$BaCl_2 + HNO_3 + H_2SO_4 + HCl \rightarrow (BaCl_2 \text{ excess}) + + BaSO_4 + (HCl + HNO_3 \text{ volatilised}), \quad (1)$$

$$BaCl_2 + 2\,Hg(OH)CN \rightarrow Ba(OH)_2 + 2\,HgCl \cdot CN. \quad (2)$$

When both halogen and nitrogen are present in the sample the absorption solution and washings are almost evaporated to dryness in a wide-necked silica conical flask, using a current of ammonia-free air to speed up the evaporation. An excess amount of standard barium chloride is added to the residue of sulphuric acid, and the evaporation continued to dryness on the water bath. The residue of barium sulphate and chloride is then treated with 1 ml of N hydrochloric acid which is evaporated off, washed with a few drops of water and again evaporated to ensure removal of all volatile acids, and the barium chloride dissolved in 5 ml of water and titrated according to Equation (2) by addition of 10 ml of a saturated solution of mercuric oxycyanide.

The solid mercuric oxycyanide reagent must be carefully purified by careful recrystallization on the water bath, by evaporating a solution until the salt crystallizes out (the dry salt explodes when heated). Because the reagent has a slight alkaline reaction when dissolved in water, it must be neutralised before use with the acid used for the alkali titration. 10 ml of the saturated solution containing about 20 g of the salt per litre, upon treatment with 0,2 ml of 0,01 N sulphuric acid should appear acid to the mixed indicator.

When halogen is the only acid-forming element present besides sulphur, the determination of the latter is quite straightforward. The total acids are simply titrated carefully with standard alkali, 10 ml of the neutralised mercuric oxycyanide added, and the liberated sodium hydroxide titrated to the mixed indicator end point with standard sulphuric acid. The alkali equivalent is a measure of the halide present, and when subtracted from the volume of alkali consumed in the first titration of the total acidity, gives the concentration of the sulphuric acid.

It has been shown previously[2, 20, 26] that both the sulphur and halogen contents can be obtained by the above procedure. When, however, it was applied in this present investigation the halogen values found were always more than 0,5% below the theoretical values. Correct halogen figures could never be obtained under rapid combustion conditions when neutral hydrogen peroxide solution was used for the absorption of halogen.

Procedures for the Determination of Halogen.

A 1 N solution of sodium hydroxide containing hydrogen peroxide was found to be the best absorption solution for chlorine and bromine. With neutral or weakly alkaline (0,01 N) peroxide solutions considerable mist was formed in the absorber, the contents of the absorber when rinsed out smelt strongly of halogen oxides, and as already stated, the resulting halogen values were considerably lower than the expected values.

A number of methods were investigated for determining the concentration of halogen collected by the alkaline absorbent, since it was desirable for simplicity and rapid application to employ volumetric procedures. Titration with 0,01 N silver nitrate solution using fluorescein and dichloro(R)fluorescein adsorption indicators, though satisfactory on the semi-micro scale, proved unreliable with the weaker concentration of halogen and rather tedious in operation for routine analysis unless the volume of solution titrated was not more than 10 ml. The potentiometric identification of the end point using a Cambridge potentiometer and modified electrode system described by *Haslam* and *Soppett*[32] was also investigated. As claimed by the authors, this modified electrode system was more sensitive than the normal system, but in the titration of chloride with 0,01 N silver nitrate solution, the drift at the end point was at times too great for accurate determinations.

The mercurimetric titration of chloride with mercuric nitrate using diphenyl carbazide as indicator was also investigated[33]. With 0,01 N solutions however, some difficulty was experienced in observing the end point due to fading of the indicator colour even though the p_H of the solution was carefully controlled.

The most satisfactory of all the titration methods investigated was the acid-alkaline method of *Vieböck*[34], employing mercuric oxycyanide. This reagent has the advantage that it is specific for chloride or bromide. In addition, since it does not react with fluoride, the reagent can be used to advantage for the analysis of mixed fluoride-chloride etc. solutions. The procedure adopted consists of neutralising the alkaline solution obtained from the absorber with 1 N sulphuric acid. The liquid is then made slightly acid with 0,01 N acid and boiled for two or three minutes to destroy excess of peroxide, and to remove any carbon dioxide originally retained by the alkaline absorbent during the combustion. The solution is then cooled to room temperature, and again brought to the neutral point with 0,01 N sodium hydroxide solution. Alkali equivalent to the concentration of halogen is then liberated by the addition of 10 ml of the neutralised mercuric oxycyanide solution, and titrated with the standard sulphuric acid solution to the mixed indicator end point.

The bromine estimation is not always so accurate as the chlorine one because of the large conversion factor employed in the calculation. For this reason the iodometric method of *Van der Meulen*[35] was investigated on the micro scale, since the use of an amplified titration would produce a very favourable conversion factor. This method has been investigated by *Alicino* et al.[36] who report that accurate bromine analysis can be obtained even after the deduction of blank values caused mainly by impurities in the sodium hypochlorite used for the oxidation of the bromine to bromate. Whereas their blank values did not exceed 0,4 ml of 0,01 N thiosulphate, those obtained in the present investigation varied between 3 to 7 ml of thiosulphate using a similar concentration of hypochlorite solution. Because of this it was decided that until purer hypochlorite solution became available the method could not be recommended for precise microanalysis.

The *Leipert*[37] iodimetric method for the determination of iodine can be applied to the rapid combustion procedure without loss of accuracy. It was found that a sodium acetate-bromine solution could be used to advantage for the collection of free iodine produced from the combustion of the sample. The bromine escaping from the absorber due to the fast current of oxygen employed was trapped by means of cotton wool soaked in formic acid contained in a small bulb attached to the outlet of the absorber with a ground joint.

Summary.

Advantages of the rapid combustion process for the micro determination of carbon and hydrogen, sulphur, and halogen are discussed, and methods for their estimation are described which have been adopted for routine analysis.

Zusammenfassung.

Die Vorteile eines raschen Verbrennungsvorganges für die Mikrobestimmung von Kohlenstoff, Wasserstoff, Schwefel und Halogen werden beschrieben. Methoden für deren quantitative Bestimmung, die sich besonders für Serienanalysen bewährt haben, werden mitgeteilt.

Résumé.

On discute les avantages du procédé rapide de combustion pour le microdosage du carbone, de l'hydrogène, du soufre et des halogènes et l'on décrit les méthodes pour leur dosage qui ont été adaptées dans les analyses en série.

Discussion.

Mr. *P. Gouverneur* (Amsterdam, Holland): Is there any solution, in the author's opinion, against the retaining of Nitrogen-oxides by the condensed water droplets in the Anhydrone tube in semimicro or even macro scale work?

Mr. *G. Ingram*: It is to be expected that the higher gas velocity applied in our rapid methods will provide all water to be chemically bound by the Anhydrone in a relatively short time. In the slower methods condensation can be prevented by warming the beak, capillaries, and bell chamber of the *Pregl* absorption tube, then no nitrogen-oxides are retained.

Mr. *W. Kirsten* (Uppsala, Sweden): We have observed that low carbon and high hydrogen figures are obtained with both the *Pregl* and other methods when incomplete combustion occurs. As there are tight layers of asbestos in the ends of the tubes of most methods it seems doubtful to me that a fog of carbon can pass there.

Have you been able to see carbon in the water absorption tube?

Mr. *G. Ingram*: In the rapid method there is no packing of asbestos in the tube, therefor any carbon formed will be swept into the water absorption tube.

Before the quartz wool plug was used in the combustion tube carbon was observed in the water absorption tube when the carbon figures were lower than theory.

Mr. *H. Wagner* (Vienna, Austria): Fanden Sie auch, daß der Titer der Bariumchlorid-Lösung nicht konstant ist?

Mr. *G. Ingram*: Ja.

Literature.

[1] *A. E. Beet* and *R. Belcher*, Fuel **19**, 42 (1940). — *R. Belcher*, ibid. **19**, 172 (1940). — *R. Belcher* and *C. E. Spooner*, ibid. **20**, 130 (1941); ibid., Ind. Chemist **19**, 653 (1943).

[2] *R. Belcher* and *C. E. Spooner*, J. Chem. Soc. London **1943**, 313.

[3] *R. O. Clark* and *G. H. Stillson*, Analyt. Chemistry **19**, 423 (1947).

[4] *R. Belcher* and *G. Ingram*, Analyt. Chim. Acta **4**, 118 (1950).

[5] *G. Ingram*, Analyst **73**, 548 (1948).

[6] *P. W. Elving* and *W. R. McElroy*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **13**, 660 (1941).

[7] *R. Belcher* and *G. Ingram*, Analyt. Chim. Acta **4**, 401 (1950).

[8] *A. F. Colson*, Analyst **73**, 541 (1948).

[9] *A. Dombrowski*, Mikrochem. **28**, 136 (1940).

[10] *A. E. Heron*, Analyst **73**, 314 (1948).

[11] *K. Bürger*, Die Chemie **55**, 260 (1942).

[12] *A. Etienne* and *R. Mileur*, Ann. Chim. Analyt. **28**, 215 (1946).

[13] *E. C. Horning* and *M. G. Horning*, Analyt. Chemistry **19**, 688 (1947).

[14] *I. Irimescu* and *B. Popescu*, Z. analyt. Chem. **128**, 185 (1948).

[15] *O. Zima*, B. I. O. S. Final Report No. 1606.

[16] *F. Pregl*, Quantitative Organic Microanalysis, 1924, p. 102. — *J. B. Niederl* and *V. Niederl*, Micromethods of Quantitative Organic Elementary Analysis, 1938, pp. 125 and 144.

[17] *A. Lacourt*, Mikrochem. **23**, 308 (1938).

[18] *C. W. Beasley*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **11**, 229 (1939).

[19] *L. T. Hallett*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **10**, 111 (1938). — *L. T. Hallett* and *J. W. Kuipers*, ibid. **12**, 357 (1940).

[20] *G. Ingram*, Analyst **69**, 265 (1944).

[21] *A. Schöberl*, Z. angew. Chem. **50**, 334 (1937).

[22] *L. T. Hallett* and *J. W. Kuipers*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **12**, 357 (1940).

[23] *C. L. Ogg, C. O. Willits* and *F. J. Cooper*, Analyt. Chemistry **20**, 83 (1948).

[24] *E. L. Brewster* and *W. Rieman*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **14**, 820 (1942).

[25] *A. Friedrich* and *O. Watzlaweek*, Z. analyt. Chem. **89**, 401 (1932).

[26] *D. T. Gibson* and *T. H. Caulfield*, Analyst **60**, 522 (1935).

[27] *R. Belcher* and *A. L. Godbert*, Analyst **66**, 289 (1941).

[28] *G. C. Manor* and *P. L. Kirk*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **9**, 198 (1937).

[29] *W. Leithe*, Mikrochem. **33**, 179 (1947).

[30] *A. Friedrich* and *F. Mandl*, Mikrochem. **22**, 14 (1937).

[31] *A. W. Marsden* and *A. G. Pollard*, J. Soc. Chem. Ind. **56**, 464 (1937).

[32] *J. Haslam* and *W. W. Soppett*, J. Soc. Chem. Ind. **67**, 33 (1948).

[33] *J. V. Dubsky* and *J. Trtek*, Mikrochem. **12**, 315 (1933). — *I. Roberts*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **8**, 365 (1936).

[34] *F. Vieböck*, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 496 (1932).

[35] *Van der Meulen*, Chem. Weekbl. **28**, 238 (1931); **31**, 558 (1934).

[36] *J. F. Alicino, A. Crickenberger* and *B. Reynolds*, Analyt. Chemistry **21**, 625 (1949).

[37] *Th. Leipert*, Mikrochim. Acta **3**, 73, 147 (1938).

Aus dem Organisch-analytischen Laboratorium der Farbenfabriken Bayer, Leverkusen.

Über die elementaranalytische Bestimmung des Sauerstoffes, eine daraus entwickelte C-H-Bestimmung und eine neue Ausführungsform der N-Dumasmethode für schwerverbrennliche Substanzen.

Von

J. Unterzaucher.

Mit 3 Abbildungen.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

I.

In den Jahren 1938/39 ist es im organisch-analytischen Laboratorium der Farbenfabriken Bayer, Leverkusen, gelungen, nach dem von *M. Schütze*[1] erstmalig mit Erfolg angewandten Prinzip eine blindwertfreie Mikromethode[2] zur direkten Bestimmung des Sauerstoffes in organischen Substanzen zu entwickeln. Damit konnte zugleich mit ihrer Einführung in die tägliche Praxis zum ersten Male die bisher übliche Tradition, den Sauerstoff aus der Differenz zu 100% zu ermitteln, verlassen und der Sauerstoff der organischen Substanzen auf direktem Wege bestimmt werden.

Die direkte Mikrosauerstoffbestimmung hatte sich in unserem Laboratorium gleich zu Anfang so gut bewährt, daß sie sich neben den alterprobten Mikromethoden nach *Pregl*[3] sofort einen ebenbürtigen Platz eroberte. Seit nunmehr 10 Jahren sind bis auf zeitweilige kriegsbedingte Unterbrechungen täglich an zwei Apparaturen Sauerstoffbestimmungen von den verschiedensten chemischen Produkten in festem, flüssigem und auch gasförmigem Zustande durchgeführt worden, deren Zahl in viele Tausende geht.

Unsere Methode beruht auf folgendem Prinzip (Abb. 1): Aus einer Stahlflasche (*1*) strömt Reinstickstoff mit einer Geschwindigkeit von 16 bis 18 ml pro Minute durch einen Reinigungs- (*6*, *7*) und Trocknungstrakt (*10*) in ein Quarzverbrennungsrohr (*13*), wo die thermische Zer-

setzung der Substanz (*17*) und anschließende Überführung des Sauerstoffes in Kohlenoxyd über einem auf 1120° C erhitzten Kohlekontakt (*18*) stattfindet. Das Kohlenoxyd setzt nach Passieren eines Alkalirohres (*21*) mit Jodpentoxyd (*22*) bei 118° C äquivalente Mengen Jod in Freiheit, die im angeschlossenen, mit Natronlauge benetzten Absorptionsrohr (*24*) aufgefangen werden. Nach Oxydation mit Brom zu Jodat und Zusatz von Jodid nach *Leipert-Vieböck-Brecher*[4] gelangt die

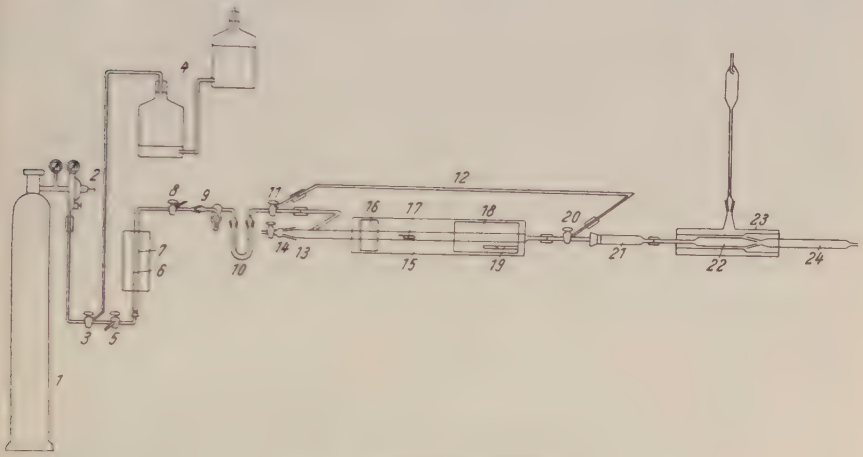


Abb. 1. *Mikrosauerstoffapparatur.*

1 Stickstoffbombe	*9* Blasenzähler	*17* Substanzschiffchen
2 Feineinstellventil	*10* Trockenrohr	*18* Elektrischer Heizofen
3 Dreiweghahn	*11* Dreiweghahn	*19* Thermoelement
4 Gasometer	*12* Umkehrspülung	*20* Dreiweghahn
5 Dreiweghahn	*13* Reaktionsrohr	*21* Alkalirohr
6 Reinigungsrohr	*14* Verschlußkappe mit Hahn	*22* Oxydationsrohr
7 Elektrischer Heizofen	*15* Ofengehäuse	*23* Hohlgranate
8 Dreiweghahn	*16* Beweglicher Brenner	*24* Absorptionsrohr

so versechsfachte Jodmenge zur Titration mit 0,02-n-$Na_2S_2O_3$. 1 mg Sauerstoff entsprechen hierbei 7,50 ml Titrationslösung. Die rasche und quantitative Entlüftung des Reaktionsrohres nach der Substanzeinführung wird durch eine Umkehrspülvorrichtung (*11, 12, 20*) erreicht, die es gestattet, den Stickstoffstrom im umgekehrten Sinne, das ist von rechts nach links durch das Reaktionsrohr zu leiten. Diese Einrichtung wurde, wie wir später erfuhren, zu gleicher Zeit auch von *H. Gysel*[5] bei der *Dumas*-Methode angewandt. Der Ablauf des beweglichen Brenners (*16*) erfolgt automatisch durch einen Synchronmotor.

Die Standardeinwaage für die Bestimmung von Konstitutionssauerstoff beträgt 3 bis 5 mg Substanz, die Genauigkeit ±0,2% relativ-U-Fehler. Zur quantitativen Ermittlung von Sauerstoffspuren werden Einwaagen von 20 mg und mehr verwendet, wobei sich eine Genauig-

keit von etwa 2% relativ-X-Fehler erreichen läßt. Außerdem gestattet die beschriebene Apparatur die Ausführung von Analysen mit Substanzeinwaagen von etwa 0,3 mg, also gewissermaßen von „Ultra-Mikroanalysen", wobei die Titration mit 0,01-n-$Na_2S_2O_3$ ausgeführt wird (Umschlagsschärfe: $^1/_2$ Tropfen). Eine Analyse in der Serie dauert 30 Min.

Das Verfahren gestattet die quantitative Bestimmung des Sauerstoffes in organischen Substanzen und solchen anorganischen Körpern, deren Sauerstoff unter den gegebenen Bedingungen thermisch quantitativ, sei es elementar oder in Form einer flüchtigen Verbindung abspaltbar ist. Voraussetzung hierbei ist jedoch, daß darin keine Stoffe enthalten sind, die Quarz unter Bildung einer flüchtigen Sauerstoffverbindung angreifen. Dies ist bei Fluor und Phosphor enthaltenden Substanzen der Fall, die bei der Analyse daher zu hohe Sauerstoffwerte liefern und eine blindwertbedingende Schädigung des Reaktionsrohres verursachen. Bei Substanzen, deren Sauerstoff thermisch nicht quantitativ abspaltbar ist, läßt sich die Sauerstoffbestimmung durch Reduktion mit Kohle ermöglichen, sofern das betreffende Metalloxyd durch Kohlenstoff reduzierbar ist. Um bei hierher gehörigen organischen Metallsalzen für die Gegenwart von genügend Kohlenstoff zu sorgen, fügen wir der eingewogenen Substanz Indulinbase bei, die sauerstofffrei ist und bei der thermischen Zersetzung reichlich Kohlenstoff im Substanzschiffchen abscheidet.

Das wichtigste Erfordernis für den guten Erfolg mit der Mikrosauerstoffbestimmung ist die gänzliche Ausschließung eines Blindwertes. Diesen Zustand der Apparatur bezeichnen wir mit *„Blindwertfreiheit"* und verstehen darunter, daß *bei Ausführung eines kompletten Analysenganges ohne Substanz die zu titrierende Lösung nach Zugabe der Stärkelösung mindestens 1 Min. lang vollkommen farblos bleibt.* Zwecks genauer Erkennung vergleicht man mit Wasser in einem danebenstehenden Titrierkölbchen gegen einen weißen Hintergrund. *Nur in diesem Zustande ergibt die Apparatur, wie die Analysen reiner Testsubstanzen zeigen, ohne jede Korrektur Resultate, die von der Theorie meist nur wenige Hundertstelprozente abweichen.* Ist dagegen schon sofort *oder während der ersten Minute nach Stärkelösungszugabe eine eben erkennbare Jodstärkereaktion zu beobachten, dann liegt im Sinne unserer Praxis ein Blindwert vor, der den Arbeitseinsatz der Apparatur verbietet*, weil unter diesen Bedingungen in der Regel Sauerstoffwerte erhalten werden, die trotz Einbeziehung der Blindwertkorrektur merkwürdigerweise noch über der Fehlergrenze liegen. Nach unseren Erfahrungen stellt der im Leerversuch ermittelte Blindwert keinen hinreichenden Korrekturfaktor dar, da dessen Größe durchwegs auffallend kleiner ist als der bei der Analyse erhaltene Fehlbetrag. Auch der Abzug einer durch Analyse reiner Testsubstanzen fest-

gestellten Blindwertgröße bedeutet die Hinnahme von Unsicherheitsfaktoren, die, ganz abgesehen von der Umständlichkeit eines solchen Verfahrens die erreichbare hohe Genauigkeit der Mikrosauerstoffbestimmung vereiteln.

Diese Befunde, die uns schon während der Entwicklungsarbeiten jedwede Methodik eines Blindwertabzuges als unanwendbar erscheinen ließen, haben dazu geführt, unser Hauptaugenmerk der vollkommenen Beseitigung des Blindwertes zuzuwenden und nach deren Erreichung die Veranlassung gegeben, *uns grundsätzlich und ausschließlich der blindwertfreien Arbeitsweise zu bedienen*. Daher haben wir uns mit den Verhältnissen bei Vorliegen eines Blindwertes und den sich hierbei unter Umständen ergebenden Möglichkeiten nicht weiter befaßt. Um so dringender ergab sich aber gerade mit Rücksicht auf das grundsätzliche Festhalten an der blindwertfreien Arbeitsweise die Notwendigkeit, bei auftretenden Schwierigkeiten die Fehlerquellen zu suchen und zu beseitigen.

Überraschenderweise traten bei uns erst nach einigen Jahren guten Erfolges ernstliche Störungen auf, die, wie wir heute sagen können, ihre Ursachen vorwiegend in der Verwendung qualitativ unzulänglicher Materialien hatten.

Die hinreichend quantitative Entfernung von zuweilen im Reinstickstoff des Handels enthaltenem Sauerstoff mit Kupfergrieß bei etwa 500° C stellt kein Problem dar, da es auf diese einfache Weise sogar gelingt, der atmosphärischen Luft soweit den Sauerstoff zu entziehen, daß der übrigbleibende Stickstoff als Transportgas bei der Mikrosauerstoffbestimmung verwendet werden kann. Davon haben wir bei der Ausarbeitung der neuen C-H-Methode[6] vorübergehend Gebrauch gemacht, als uns der Zufall hierbei die unerwartete Entdeckung in die Hände gespielt hatte, daß der Reinstickstoff des Handels zuweilen Wasserstoff enthielt. Dies war für die Sauerstoffbestimmung insofern von Bedeutung, als damit eine Blindwertquelle aufgefunden worden war, die uns vermutlich vorher schon des öfteren Schwierigkeiten bereitet hatte, ohne daß jemand auf den Gedanken an eine solche Möglichkeit gekommen wäre. Mit der Entfernung des Wasserstoffes aus dem Reinstickstoff über erhitztem Kupferoxyd und Absorption des gebildeten Wassers war die Blindwertfreiheit der Apparatur wieder hergestellt. Da der Reinstickstoff des Handels nach unseren Erfahrungen in der Regel einer Vorreinigung bedarf, dürfte es unter Umständen bequemer und vorteilhafter sein, an dessen Stelle gewöhnlichen Handelsstickstoff zu verwenden, den man mit Kupfer selbst leicht sauerstofffrei machen kann.

Die als Sperrflüssigkeit dienende konz. Schwefelsäure des Blasenzählers wurde durch Paraffinöl ersetzt, nachdem wir gefunden hatten,

daß dieselbe durch Abgabe von Schwefeldioxyd zu einer Blindwertquelle werden kann.

Die Reinigung neuer Reaktionsrohre mit Schwefelchromsäure hatte sich lange Zeit hindurch als hinreichend erwiesen, bis es eines Tages nicht mehr gelang, bei frisch beschickten Rohren Blindwertfreiheit zu erhalten. Auffallenderweise zeigten sich schon nach wenigen Stunden Ausglühens an der inneren Rohroberfläche des mit Kohle gefüllten Teiles deutlich sichtbare weiße Punkte, die sonst meist erst nach 400 bis 500 Analysen zu beobachten sind und mit einem gleichzeitig auftretenden Blindwert die beendete Lebensdauer des Rohres anzeigen. Offenbar handelt es sich in beiden Fällen um eine Einwirkung des Kohlenstoffes auf das Quarzmaterial unter Bildung einer flüchtigen sauerstoffhaltigen Verbindung, von der wir annehmen, daß es Kohlenoxyd ist. Diesem Übelstande kann leicht dadurch vorgebeugt werden, daß man ein neues Rohr vor Gebrauch mit 40%iger Flußsäure behandelt. Zu diesem Zwecke läßt man das neue Rohr mit der Flußsäure vollgefüllt eine Stunde lang vertikal stehen. Hierbei kann man meist beobachten, daß ein feines weißes Pulver längs der Rohrwandung zu Boden gleitet. Woraus dasselbe besteht, ist noch nicht untersucht worden.

Wie bereits in meinem Vortrage[7] anläßlich der Arbeitstagung für Mikrochemie 1942 in München erwähnt, ist die Einhaltung der erforderlichen Temperatur des Kohlekontaktes, wofür 1120° C angegeben wurden, von entscheidender Bedeutung. Die weiteren Erfahrungen haben dies bestätigt und erkennen lassen, daß *auf weitestgehende Erreichung der Temperaturkonstanz größter Wert zu legen ist.* Schwankungen über ±5° sind unter allen Umständen zu vermeiden, um sich nicht der Gefahr auszusetzen, in den Möglichkeitsbereich von Blindwerten zu geraten, die besonders deutlich bei Temperaturanstieg zu beobachten sind. Dem Zwecke am besten entsprechend ist eine automatische Temperaturregelung, die durch ein Pt-PtRh-Thermoelement gesteuert wird und dem Analytiker die beständige Kontrolle erspart. Im Temperaturgebiet über 1120° C sind Versuche bei 1170° C, 1190° C und 1220° C gemacht worden. Während es bei 1170° C noch gelang, Blindwertfreiheit und korrekte Sauerstoffwerte zu erhalten, wurden bei 1190° C schon Blindwerte von 0,06 bis 0,08 ml 0,02-n-$Na_2S_2O_3$ beobachtet und dementsprechend höhere Analysenzahlen erhalten. Bei 1220° C stiegen die Blindwerte bereits auf 0,12 bis 0,16 ml 0,02-n-$Na_2S_2O_3$ an und die Analysen ergaben Zahlen, die schon weit über der Theorie lagen. Versuche, die nun mit demselben Rohr wieder bei der normalen Arbeitstemperatur von 1120° C ausgeführt wurden, zeigten, daß Blindwertfreiheit nicht mehr zu erreichen war. Da sich diese Versuche nur auf einige Tage erstreckten,

kann man sehen, daß die angewandten Temperaturen genügen, dem Rohr schon in kurzer Zeit eine dauernde Schädigung zuzufügen. Darauf deuten auch die hierbei wieder in Erscheinung getretenen charakteristischen weißen Flecken an der inneren Rohrwandung hin, die bei weiterem Gebrauch genau so wie die Blindwerte an Größe zunehmen.

Die verwendete Kohle, die wir uns aus Gasruß mit der Bezeichnung VA 416 selbst herstellen, soll möglichst aschefrei sein, doch kommt es vor allem darauf an, daß dieselbe keine störenden Substanzen enthält.

Das Alkalirohr wird zu einer Blindwertquelle, sobald dessen Füllmaterial, bestehend aus Kaliumhydroxyd oder Natronasbest, soweit verbraucht ist, daß störende Begleitgase in das Oxydationsrohr gelangen können. Äußerlich ist dies leider nicht zu erkennen, so daß man am besten nach einer bestimmten Anzahl von Analysen, etwa 200, regelmäßig eine Neufüllung vornimmt, falls nicht schon vorher ein auf diese Quelle weisender Blindwert dazu Veranlassung bietet.

Bei der Mannigfaltigkeit der möglichen Blindwertursachen ist es schwer zu sagen, ob wir das Jodpentoxyd mit Recht oder Unrecht als die häufigste Blindwertquelle bezeichnen können. Für den Zweck der Mikrosauerstoffbestimmung muß das Jodpentoxyd so beschaffen sein, daß es im blinden Versuch, wobei der Stickstoffstrom unter Umgehung des Reaktionsrohres direkt durch das Oxydationsrohr geleitet wird, selbstverständlich die Forderung nach Blindwertfreiheit im Sinne der gegebenen Definition vollkommen erfüllt. Leider besitzen auch die besten Handelspräparate diese Eigenschaft oft nicht, wovon wir uns besonders während des Krieges überzeugen konnten. Sie geben unter den bei der Mikrosauerstoffbestimmung herrschenden Bedingungen laufend geringe Jodmengen ab, die dann bei der Blindwertkontrolle unter Verwendung der Multiplikation nach *Leipert*[4] deutlich in Erscheinung treten. Vielfach konnte beobachtet werden, daß die Präparate beim Trocknen bei erhöhter Temperatur rötlich bis rotbraun wurden; andere blieben unverändert weiß, ohne jedoch den gestellten Anforderungen zu genügen. Bei näherer Untersuchung stellte sich heraus, daß diese Produkte durchwegs wechselnde Mengen wasserunlöslicher Bestandteile enthielten, die aller Wahrscheinlichkeit nach für die erwähnten Unzulänglichkeiten verantwortlich zu machen sind. Dafür spricht vor allem auch der Umstand, daß wir durch Umkristallisieren solchen käuflichen Jodpentoxydes aus starker Salpetersäure zu einem in Wasser klar löslichen Produkt gelangten, das ein völlig blindwertfreies Arbeiten gestattete. Erfreulicherweise ist seit einiger Zeit im Handel wieder einwandfreies Jodpentoxyd erhältlich, das nur noch getrocknet zu werden braucht. Erwähnenswert ist noch, daß auch einwandfreie Jodpentoxydpräparate sofort nach dem Einfüllen in das

Oxydationsrohr minimale Jodabgabe zeigen; erst nach sechs- bis achtstündigem Durchleiten von Stickstoff im Eisessigheizbad stellt sich allmählich Blindwertfreiheit ein.

Blindwerte sind ferner beobachtet worden, die durch Verwendung verunreinigter Reagenzien bei der Jodbestimmung zustande kamen. Bei Vorhandensein eines Blindwertes ist es daher zweckmäßig, auch eine Reagenzienkontrolle durchzuführen, die der Jodbestimmung bei der Analyse analog ist. Da Brom pro analysi meist etwa 0,05% Jod enthält, sind wir dazu übergegangen, auch diese an sich noch nicht störende Fehlerquelle zu verringern, indem wir für eine Analyse an Stelle von 10 Tropfen Brom 10 ml einer Brom-Eisessig-Kaliumacetatlösung verwenden, die pro Liter nur 4 ml Brom enthält. Um die Gefahr des Einatmens von Brom auszuschließen, wird der Inhalt des Absorptionsrohres in ein leeres Kölbchen gespült und dann die Brom-Eisessig-Acetatlösung mit einer automatischen Pipette hinzugefügt.

Zusammenfassend ergeben sich in der Hauptsache folgende Fehlerquellen, die einen Blindwert hervorrufen: 1. Verwendung von Reagenzien unzulänglicher Reinheit, 2. Inkonstanz der Kontaktofentemperatur, 3. Gebrauch ungenügend gereinigter oder an der inneren Oberfläche beschädigter Reaktionsrohre.

Die tägliche Kontrolle der Mikrosauerstoffapparatur erfolgt durch Blindversuch und Testanalyse; auf letztere kann unter Umständen auch verzichtet werden. Bei der Analyse flüssiger, leicht flüchtiger und kristallösungsmittelhaltiger Substanzen läßt sich ein Substanzverlust während der Gegenstromspülung durch Kohlensäureeiskühlung des Rohres leicht ausschließen.

In apparativer Hinsicht ergab sich keine Veranlassung zu wesentlichen Änderungen. Erwähnt sei, daß der Konus des Oxydationsrohres mit einem Röhrchenansatz versehen wurde, der in die zylindrische Erweiterung des Absorptionsrohres hineinreicht, die zur Aufnahme der Natronlauge dient. Hierdurch wird verhindert, daß geringe Jodmengen in den Schliff eindringen, was bei längerem Gebrauch durch allmähliche Braunfärbung der Schliffflächen zu erkennen ist (s. Abb. 2).

II.

Die guten Erfahrungen mit der Mikrosauerstoffbestimmung[2] boten den Anlaß, einen Schritt weiter zu gehen und zu versuchen, auf dieser Grundlage eine Mikromethode[6] zur Bestimmung des Kohlenstoffes und Wasserstoffes zu entwickeln in der Erwartung, möglicherweise zu einem vorteilhafteren Verfahren zu gelangen. Das Prinzip der neuen Methode ist folgendes (Abb. 2):

Die zu untersuchende Substanz wird im Luftstrom über Kupferoxyd verbrannt. Der mit den Verbrennungsprodukten Wasser und

Kohlendioxyd mitgeführte überschüssige Sauerstoff wird durch erhitztes Kupfer bei rund 500° C quantitativ aus dem Gasstrom entfernt, wobei auch die Zerlegung der gebildeten Stickoxyde stattfindet[8]. Der Gasstrom wird dann über entwässertes Bariumchlorid geleitet, von dem das Wasser absorbiert und festgehalten wird, während das Kohlendioxyd nach dem Prinzip der Sauerstoffbestimmung über dem Kohlekontakt in Kohlenoxyd übergeführt, mit Jodpentoxyd zur Reaktion gebracht und über das entstehende Jod maßanalytisch bestimmt wird. Unmittelbar darauf wird das im Bariumchlorid inzwischen festgehaltene Wasser durch Erhitzen ausgetrieben und in derselben Weise wie das Kohlendioxyd über dem Kohlekontakt zu Kohlenoxyd umgesetzt, mit Jodpentoxyd oxydiert und über das Jod durch Titration bestimmt.

Nach den hierbei stattfindenden Reaktionsfolgen kommen ungewöhnlich große Übersetzungsverhältnisse zustande, die in den folgenden Umrechnungsfaktoren ihren Ausdruck finden:

$$1\,\text{mg C} = 19{,}98\,\text{ml } 0{,}02\text{-n-}Na_2S_2O_3;$$
$$1\,\text{mg H} = 59{,}52\,\text{ml } 0{,}02\text{-n-}Na_2S_2O_3.$$

Dieser Sachverhalt wird am deutlichsten durch ein praktisches Beispiel veranschaulicht, wobei bei einer Substanzeinwaage von 3,000 mg Benzoesäure

für den Kohlenstoffgehalt von 68,84% 41,27 ml 0,02-n-$Na_2S_2O_3$,
für den Wasserstoffgehalt von 4,95% 8,84 ml 0,02-n-$Na_2S_2O_3$

verbraucht werden. Demgemäß bestehen für die Bestimmung dieser beiden Elemente äußerst günstige Voraussetzungen in bezug auf Genauigkeit, denn ein Titrationsfehler von 0,02 ml 0,02-n-$Na_2S_2O_3$ im vorliegenden Fall bedingt beim Kohlenstoff einen Fehler von 0,04%, beim Wasserstoff einen Fehler von 0,01% absolut. Diese günstigen Voraussetzungen erfahren ihre volle Auswertung durch den blindwertfreien Reaktionsablauf und die Schärfe der jodometrischen Titration, wodurch für Kohlenstoff und Wasserstoff eine beachtlich größere Genauigkeit als mit den bisherigen Mikromethoden erreicht wird. Dies trifft insbesondere für die Wasserstoffbestimmung zu, deren Genauigkeit im Gegensatz zu der bisher üblichen eine wirkliche praktische Bedeutung erhält. Da die jodometrische Titration bekanntlich mit 0,01-n-Lösungen ein exaktes Arbeiten gestattet, wird es hierdurch möglich, mit Substanzmengen von einigen wenigen Zehntelmilligrammen noch brauchbare Analysenzahlen zu erhalten.

Die neue Kohlenstoff-Wasserstoff-Apparatur (Abb. 2) stellt entsprechend dem Prinzip der Methode eine Kombination einer automatischen Mikroverbrennungsapparatur mit der Mikrosauerstoffapparatur

dar. Zwischen beiden befindet sich gewissermaßen als Verbindungsstück die Bariumchloridschicht zur quantitativen Trennung des Wassers vom Kohlendioxyd. Aus dem Gasreinigungs- und Trocknungstrakt (*3* bis *10*) kann man mittels Hahn (*3*) entweder Luft oder Reinstickstoff in die Verbrennungsapparatur einströmen lassen. Letzterer kann, wie schon erwähnt, aus Luft oder gewöhnlichem Stickstoff mittels Kupfer (*6*) erhalten werden und dient nach beendigter Verbren-

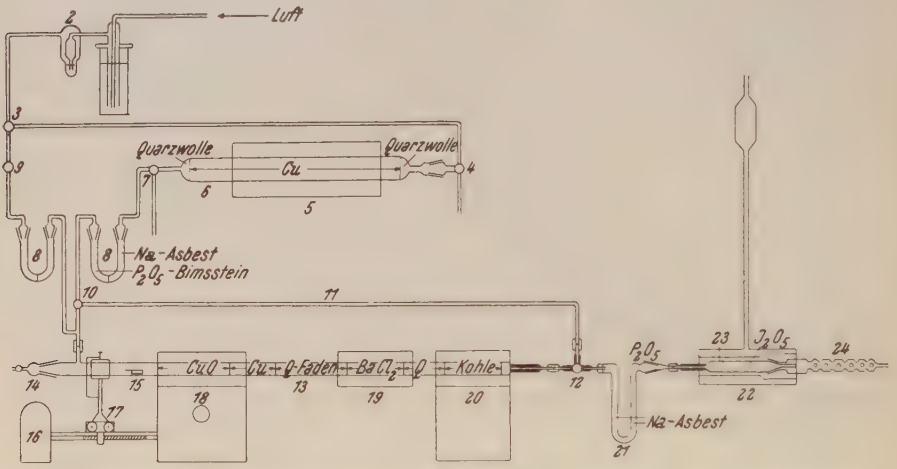


Abb. 2. *Apparatur zur jodometrischen Mikro-C-H-Bestimmung.* (Der besseren Übersicht halber ist die Gasreinigungsanlage schematisch dargestellt.)

1 Druckregler	*9* Regulierhahn	*17* Brenner mit Antrieb
2 Blasenzähler	*10* Dreiweghahn	*18* Elektrischer Ofen
3 Dreiweghahn	*11* Umkehrspülung	*19* Ofen für $BaCl_2$
4 Dreiweghahn	*12* Dreiweghahn	*20* Elektrischer Ofen
5 N-Reinigungsofen	*13* Verbrennungsrohr	*21* Na-Asbestrohr
6 N-Reinigungsrohr	*14* Verschlußkappe mit Hahn	*22* Hohlgranate
7 Dreiweghahn	*15* Substanzschiffchen	*23* Oxydationsrohr
8 Trocknungsrohr	*16* Synchronmotor	*24* Absorptionsrohr

nung als Transportgas für Wasser und Kohlendioxyd. Die Abzweigung (*10* bis *12*) stellt die Umkehrspülvorrichtung dar, mit deren Hilfe es leicht gelingt, das Eindringen von Wasser und Kohlendioxyd enthaltender Zimmerluft während der Substanzeinführung auszuschließen. Das als Fehlerquelle ersten Ranges bekannte Bleidioxyd[9, 10] ist durch metallisches Kupfer ersetzt, das neben der Fähigkeit, die Stickoxyde zu zerlegen und den Sauerstoff quantitativ herauszuschaffen, noch die angenehme Eigenschaft besitzt, weder auf die Verbrennungsprodukte Wasser und Kohlendioxyd merklich einzuwirken, noch meßbare Mengen derselben zurückzuhalten. Die Verwendbarkeit des metallischen Kupfers für diesen Zweck hatte sich schon bei unserer neuen Ausführungsform der *Dumas*-Methode[11] in der endständigen

Anordnung so deutlich herausgestellt, daß wir dieses Prinzip ohne Bedenken auch auf die neue C-H-Methode übertragen konnten. Neuerdings wurde die Kupferschicht aus dem Verbrennungsofen heraus verlegt und mit einem eigenen Heizofen versehen. Der Verbrauch des Kupfers durch Sauerstoffaufnahme wird dadurch auf ein Mindestmaß beschränkt, daß nur während der Verbrennung selbst Luft in das Verbrennungsrohr geleitet wird, wobei deren Sauerstoff in der Hauptsache zur Substanzverbrennung und Regenerierung des dabei reduzierten Kupferoxydes verbraucht wird, so daß das Kupfer durch den noch verbleibenden Rest nur eine verhältnismäßig geringe Beanspruchung erfährt. Halogene werden durch metallisches Silber zurückgehalten (in der Zeichnung weggelassen). Die Bariumchloridschicht ist beiderseits durch eine Lage von Quarzsplittern gegen Wärmeübertragung geschützt. Die noch folgenden apparativen Einrichtungen (*20* bis *24*) entsprechen vollkommen denen der Mikrosauerstoffbestimmung[2].

Die Ergebnisse, die wir bei der Analyse reiner Testsubstanzen (Benzoesäure, Anthranilsäure, Acetanilid, m-Nitranilin, Chlorbenzoesäure) erhalten konnten, waren überraschend gut. Die gefundenen Werte weichen in der Regel nur wenige Hundertstelprozente von den berechneten ab. Besonders deutlich äußert sich dies beim Wasserstoff. Die Einwaagen betrugen 3 bis 4 mg.

Des Interesses halber haben wir einige Versuche mit Substanzmengen von 0,1 bis 0,3 mg durchgeführt. Zu diesem Zwecke wurden zur Erzielung hinreichend genauer Einwaagen Substanzverreibungen mit sehr feinem Quarzpulver hergestellt und die Titration mit 0,01-n-$Na_2S_2O_3$ ausgeführt. Hierbei hat sich gezeigt, daß mit so kleinen Substanzmengen durchwegs brauchbare Analysenresultate erhalten werden können, da die Titrationsvolumina, die für Kohlenstoff rund 3 bis 9 ml 0,01-n-$Na_2S_2O_3$, für Wasserstoff rund 0,7 bis 2,5 ml 0,01-n-$Na_2S_2O_3$ betragen, jodometrisch noch mit ausreichender Genauigkeit meßbar sind.

III.

Bei den Versuchen, die Mikro-*Dumas*-Methode zu einem auch für schwerverbrennliche Substanzen anwendbaren Verfahren auszugestalten, gelangten wir 1947 zu einer neuen Ausführungsform[11], deren Prinzip folgendes ist (Abb. 3):

Die in einem Platinschiffchen eingewogene Substanz wird zum Unterschied von der bisherigen Methodik in einem feuchten Kohlendioxyd-Sauerstoff-Strom über Kupferoxyd verbrannt, der dann am Ende des Verbrennungsrohres über erhitztes Kupfer geleitet wird. Hierbei wird der überschüssige Sauerstoff quantitativ aus dem Gasstrom entfernt. Der entbundene Stickstoff wird wie bisher in einem Azotometer über Kalilauge aufgefangen und aus dem Volumen bestimmt. Die

Genauigkeit der Methode beträgt ±0,2% relativ-U-Fehler, die Analysendauer in der Serie rund 25 Min.

Das Wesentliche dieses Verfahrens besteht vor allem darin, daß in jedem Augenblicke der Analyse für die Verbrennung schwerverbrennbarer, stickstoffhaltiger Substanzreste freier Sauerstoff zur Verfügung steht, so daß die Möglichkeit zur restlosen Verbrennung der Substanz zu Wasser und Kohlendioxyd und damit auch zur quantitativen Entbindung des vorhandenen Stickstoffes gegeben ist. Begünstigend auf den Verbrennungsprozeß wirkt hierbei das vom Gasstrom aus dem

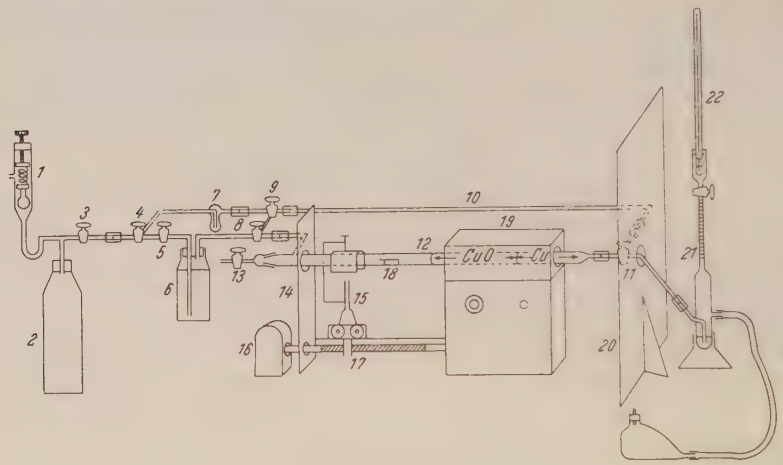


Abb. 3.

1 Überdruckventil
2 Thermosflasche f. Trockeneis
3 Feineinstellhahn
4 Dreiweghahn z. Umkehrspülung
5 Feineinstellhahn
6 Sauerstoffentwickler
7 Blasenzähler
8 u. *9* Verbindungshähne
10 Umkehrspülung
11 Dreiweghahn
12 Verbrennungsrohr
13 Verschlußkappe mit Hahn
14 Halterung
15 Bewegl. Brenner mit Dach
16 Synchronmotor
17 Brennerantrieb
18 Substanzschiffchen
19 Elektrischer Langofen
20 Wärmeschutzscheibe
21 Azotometer
22 Reduktometer

Sauerstoffentwickler mitgeführte Wasser ein, wodurch die Bedingungen für die Vergasung der Rückstandskohle gegeben sind. Die hieraus sich ergebende Arbeitsweise ist dadurch charakterisiert, daß so wie bei der C-H-Bestimmung vom Anfang bis zum Ende der Analyse ein konstanter Gasstrom durch das Verbrennungsrohr fließt.

Die Sauerstoffbeigabe kann man auf einfachste Weise dadurch erreichen, daß man das Kohlendioxyd, am besten aus Trockeneis (*2*), durch ein verschlossenes Gefäß mit 30%igem Wasserstoffperoxyd (*6*) leitet, dem zur Beschleunigung des Zerfalles kleine Platinstückchen hinzugefügt sind. Hierbei beladt sich das Kohlendioxyd mit der jeweils sich entwickelnden Sauerstoffmenge, die teils zur Substanzverbrennung, teils aber zur Regenerierung des dabei reduzierten Kupferoxydes dient.

Diese unter den herrschenden Umständen von selbst verlaufende Regenerierung des Kupferoxydes ist insofern von großer Bedeutung für die neue Arbeitsweise, als hierdurch das sonst nach jeder Analyse nötige Erkaltenlassen, Entleeren und Neufüllen des Verbrennungsrohres (*12*) überflüssig wird und in Wegfall kommt. Das Verbrennungsrohr bleibt daher, wie bei der C-H- und Sauerstoffbestimmung ohne Unterbrechung im Verbrennungsofen (*19*) bei der vorgeschriebenen Temperatur, woraus zunächst eine beachtliche Zeitersparnis resultiert. Als weitere Folge der automatischen Kupferoxydregenerierung im Zusammenhang mit der beständigen Gegenwart von freiem Sauerstoff ergibt sich die Möglichkeit, die Verbrennung der Substanz im Platinschiffchen (*18*) vorzunehmen, so daß das bisher übliche Mischen mit Kupferoxyd unnötig ist. Auf diese Weise wird im Zusammenwirken mit der Umkehrspülvorrichtung (*10*) jedwede Berührung der Rohrfüllung mit der Atmosphäre und hierdurch bedingte Aufnahme von Luft gänzlich ausgeschlossen. All diese Umstände ergeben eine Apparatur, die dadurch charakterisiert ist, daß ihre sämtlichen Teile, einschließlich Azotometer, während einer Serie von Analysen miteinander in Verbindung bleiben und nicht mehr wie bisher nach jeder Analyse auseinandergenommen werden müssen. Der Ablauf des beweglichen Gasbrenners (*15*) erfolgt automatisch durch einen Synchronmotor (*16, 17*).

Das endständige Kupfer in der bei der Mikrosauerstoffbestimmung[2] angewandten Grießform ist nach unseren Erfahrungen für den vorliegenden Zweck der Stickoxydzerlegung und quantitativen Sauerstoffentfernung vortrefflich geeignet. Den klarsten Beweis hierfür haben wir in der Tatsache, daß wir bei unserer Arbeitsweise Mikroblasen erhalten, die sich in der Größe nicht von jenen unterscheiden, die beim direkten Einleiten des reinen Kohlendioxydes über das Umleitungsrohr (*10*) unter Umgehung des Verbrennungsrohres erhalten werden. Dieselben sind in der Regel so klein, daß sie mit freiem Auge kaum noch festgestellt werden können. Der Sauerstoffgehalt des Gasstromes ist so gewählt, daß während der Dauer der Analyse rund 4 ml Sauerstoff in das Verbrennungsrohr gelangen. Die Reduktion der verbrauchten endständigen Kupferschicht erfolgt am besten mit Wasserstoff, wobei auf die Eigenschaft des Kupfers, Wasserstoff festzuhalten, zu achten ist. Die Wirksamkeitsbeeinträchtigung der Kupferschicht durch Aufnahme von Halogen kann leicht durch eine vorgelegte Silberwolleschicht vermieden werden. Das Azotometer (*21*) ist durch eine Wärmeschutzscheibe (*20*) gegen die Wärmestrahlung des Ofens geschützt; mit dieser Vorsichtsmaßnahme kann die Azotometerablesung unbedenklich an Ort und Stelle, d. h. ohne Loslösung von der Apparatur, vorgenommen werden.

Die beschriebene Methode steht seit 1947 bei uns in täglicher Verwendung und hat sich auch bei schwerverbrennlichen Substanzen, wie beispielsweise Hämin, gut bewährt. Mittlerweile haben wir das Prinzip auch auf die Makromethodik übertragen und dabei gefunden, daß es auch da mit Vorteil angewendet wird.

Zusammenfassung.

Im ersten Teil wird ein Überblick über die Erfahrungen aus der zehnjährigen Praxis der vom Verfasser beschriebenen blindwertfreien jodometrischen Mikrosauerstoffbestimmung gegeben. Prinzip der Methode und Apparatur werden an Hand einer Skizze erläutert. Die Apparatur gestattet die Ausführung von Halbmikro-, Mikro- und Spurenbestimmungen. Für die Bestimmung von Konstitutionssauerstoff werden 3 bis 5 mg, für die Spurenbestimmung 20 mg und mehr verwendet; die Genauigkeit der ersteren beträgt etwa ±0,2% relativ-U-Fehler, die der letzteren ungefähr ±2% relativ-X-Fehler. Dieselbe Apparatur gestattet die Ausführung von Ultramikrobestimmungen mit Einwaagen von 0,3 mg Substanz, wobei mit 0,01-n-$Na_2S_2O_3$ titriert wird. Eine Analyse in der Serie dauert 30 Min. Die Methode ermöglicht die Bestimmung des Sauerstoffes in organischen und solchen anorganischen Körpern, deren Sauerstoff unter den gegebenen Bedingungen thermisch quantitativ abspaltbar ist. Die Anwesenheit von Fluor und Phosphor stört. Der Anwendungsbereich konnte durch Zugabe geeigneter sauerstofffreier Substanzen (Indulinbase) auch auf solche Salze und Oxyde ausgedehnt werden, deren Metalle durch Kohlenstoff reduzierbar sind.

Die beschriebene Methode zeichnet sich durch „völlige Blindwertfreiheit" aus, die in unserer Praxis grundsätzlich die Vorbedingung für den Arbeitseinsatz der Apparatur bildet. Unter Blindwertfreiheit in diesem Sinne verstehen wir, daß bei Ausführung eines kompletten Analysenganges ohne Substanz die zu titrierende Lösung nach Zugabe der Stärkelösung *mindestens 1 Min. lang vollkommen farblos bleibt.*

Nur unter solchen Bedingungen werden einwandfreie Sauerstoffwerte erhalten. Ein Blindwertabzug vom Resultat fällt daher in jedem Falle gänzlich fort.

Im weiteren werden die bisher beobachteten Fehlerquellen, die Blindwerte verursachen können, und deren Vermeidung besprochen. Als solche kommen in Betracht: 1. Verwendung von Reagenzien unzulänglicher Reinheit, wie Transportgas, Blasenzählerflüssigkeit, Kontaktkohle, Jodpentoxyd, Brom, K- und Na-Acetat, Wasser usw. (Reagenzienkontrolle!). 2. Inkonstanz der Temperatur des Kohlekontaktes, die nicht mehr als ±5° C betragen darf. Auf weitestgehende Erreichung der Temperaturkonstanz ist größter Wert zu legen. 3. Gebrauch ungenügend gereinigter oder an der inneren Oberfläche beschädigter Reaktions-

rohre. Vor der Verwendung wird jedes Reaktionsrohr mit 40%iger Flußsäure behandelt. Nach 400 bis 500 Analysen treten in der Regel Blindwerte auf, die vermutlich durch Reaktion der Kohle mit dem Quarzmaterial zustande kommen und von der Bildung weißer Punkte an der inneren Rohroberfläche begleitet sind. Diese Erscheinungen, die die beendete Lebensdauer des Rohres anzeigen, wurden zuweilen auch schon bei Ingebrauchnahme neuer Rohre beobachtet, die nicht mit Flußsäure vorbehandelt waren, sowie bei Überhitzung.

Im zweiten Teil wird ein neues aus der Sauerstoffbestimmung entwickeltes Verfahren zur Mikro-C-H-Bestimmung beschrieben. Danach wird die Substanz im Luftstrom über Kupferoxyd verbrannt. Der mit den Verbrennungsprodukten Wasser und Kohlendioxyd mitgeführte überschüssige Sauerstoff wird durch erhitztes Kupfer bei rund 500° C quantitativ aus dem Gasstrom entfernt. Dieser wird dann zwecks Absorption des Wassers über entwässertes Bariumchlorid geleitet, während das Kohlendioxyd nach dem Prinzip der Sauerstoffbestimmung über dem Kohlekontakt zu Kohlenoxyd reduziert, mit Jodpentoxyd umgesetzt und über das entstehende Jod maßanalytisch bestimmt wird. Hernach wird das im Bariumchlorid inzwischen festgehaltene Wasser durch Erhitzen ausgetrieben, über dem Kohlekontakt in Kohlenoxyd übergeführt, mit Jodpentoxyd umgesetzt und über das Jod durch Titration bestimmt. Durch die günstigen Umrechnungsfaktoren läßt sich sowohl für Kohlenstoff, als auch insbesondere für Wasserstoff eine erheblich höhere Genauigkeit als bisher erreichen. Hierfür sind von entscheidendem Einfluß die völlige Blindwertfreiheit und die Schärfe der jodometrischen Titration. Die gefundenen Werte bei Einwaagen von 4 mg weichen in der Regel nur wenige Hundertstelprozente von den berechneten ab. Verfahren und Apparatur erlauben die Ausführung von Ultramikrobestimmungen von Kohlenstoff und Wasserstoff mit Einwaagen von 0,1 bis 0,3 mg, wobei unter Verwendung von 0,01-n-$Na_2S_2O_3$ durchwegs brauchbare Analysenresultate erhalten werden können.

Der dritte Teil behandelt eine neue Ausführungsform der Mikro-*Dumas*-Methode für schwerverbrennliche Substanzen, deren Prinzip darin besteht, daß die in einem Platinschiffchen eingewogene Substanz in einem feuchten Kohlendioxydsauerstoffstrom über Kupferoxyd verbrannt wird, der dann am Ende des Verbrennungsrohres über erhitztes Kupfer geleitet wird. Hierbei wird der überschüssige Sauerstoff quantitativ aus dem Gasstrom entfernt. Der entbundene Stickstoff wird wie bisher in einem Azotometer über Kalilauge aufgefangen und bestimmt.

Das Wesentliche dieses Verfahrens besteht darin, daß in jedem Augenblicke der Analyse für die Verbrennung schwerverbrennbarer, stickstoffhaltiger Substanzreste freier Sauerstoff zur Verfügung steht, der die restlose Verbrennung der Substanz ermöglicht. Das vom Gas-

strom aus dem Sauerstoffentwickler mitgeführte Wasser wirkt begünstigend auf den Verbrennungsprozeß ein, da hierdurch die Bedingungen für die Vergasung der Rückstandskohle gegeben sind. Durch die beständige automatische Regenerierung des Kupferoxydes fällt die sonst nach jeder Analyse nötige Neufüllung des Rohres weg, so daß das Verbrennungsrohr ohne Unterbrechung bei der vorgeschriebenen Temperatur gehalten wird und alle Apparaturteile einschließlich Azotometer während einer Analysenserie dauernd miteinander verbunden bleiben.

Zur Erzeugung des Kohlendioxyd-Sauerstoffstromes wird Kohlendioxyd aus Trockeneis durch eine Flasche mit 30%igem Wasserstoffperoxyd geleitet. Die Genauigkeit beträgt ±0,2% relativ-U-Fehler, die Dauer etwa 25 Min. Das Verfahren ist seit drei Jahren in täglicher Verwendung und hat sich auch bei schwerverbrennlichen Substanzen wie auch in der Makromethodik bewährt.

Die Substanzverbrennung erfolgt bei der Sauerstoffbestimmung, beim neuen C-H-Verfahren und bei der beschriebenen Ausführungsform der *Dumas*-Methode automatisch durch einen mit Synchronmotor fortbewegten Gasbrenner.

Es ist beabsichtigt, in der Folgezeit eine ausführliche Darstellung der drei erwähnten Verfahren mit den erforderlichen Angaben für die praktische Anwendung unter Berücksichtigung der gesammelten Erfahrungen in dieser Zeitschrift zu bringen.

Summary.

A review is given of the experiences gleaned from the 10-year use of the blank-free iodometric micro-determination of oxygen described by the author. The principle of the method and the apparatus is explained by reference to a diagram. The equipment permits the determination of semi-micro-, micro- and trace quantities. For the determination of constitutional oxygen, 3–5 mg are used; for the determination of traces, 20 mg and more. The accuracy of the former is about ± 0,2% relative-U-error; that of the latter is around ± 2% relative-X-error. The same apparatus permits ultramicro-determinations with samples of 0,3 mg substance, where the titration is made with 0,01 N thiosulfate. An analysis in a series requires 30 minutes. The method makes it possible to determine the oxygen in organic and such inorganic materials, whose oxygen can be split off quantitatively by heat under the given conditions. The presence of fluorine and phosphorus interferes. The range of application could be extended by the addition of suitable oxygen-free substances (induline bases), to such salts and oxides, whose metals are reducible by carbon.

The described method is characterized by "complete freedom from a blank", which in the authors practice essentially constitutes the preliminary condition for the working set-up of the apparatus. By "freedom from blank" in this sense is meant that when a complete analytical procedure is carried through without a sample, the solution to be titrated *remains completely colorless for at least 1 minute* after the addition of the starch solution.

The further discussion deals with the hitherto observed sources of error, which can produce blank values, and their avoidance. Among these are: 1. Use of reagents of inadequate purity, such as cylinder gas, bubble counter liquid, contact charcoal, iodine pentoxide, bromine, potassium- and sodium acetate, water, etc. (Reagent control!). 2. Inconstancy of the temperature of the charcoal contact, which may not exceed $\pm$ 5° C. Extreme importance attaches to the maximum attainment of temperature constancy. 3. Use of insufficiently cleaned reaction tubes or those whose inner surfaces are damaged. Before use, each reaction tube is treated with 40% hydrofluoric acid. After 400—500 analyses, blank values usually appear, which presumably are due to reaction of the charcoal with the quartz and are accompanied by the formation of white dots on the inner surface of the tubes. This phenomenon, which signals the end of the life of the tube, is occasionally observed when a tube, which has not been treated with hydrofluoric acid is being put into service, and also when the tubes are overheated.

The second part of the paper describes a new procedure for micro-C-H-determination, which developed from the oxygen determination. The sample is burned in a current of air over copper oxide. The excess oxygen accompanying the combustion products (H_2O; CO_2) is removed quantitatively from the gas stream by copper heated to about 500° C. The water is taken out of the gas stream by anhydrous barium chloride, whereas the carbon dioxide, in accord with the principle of the oxygen determination, is reduced to carbon monoxide over the carbon contact mass, then reacted with iodine pentoxide and determined via the iodine by titration. Because of the favorable conversion factors, a considerably greater accuracy is obtained for carbon and especially for hydrogen than was secured previously. Of decisive influence in this procedure is the complete absence of blank values, and the sharpness of the iodine titration. With samples of 4 mg, the found values deviate, as a rule, only a few hundredths of a percent from the calculated values. The procedure and apparatus permit the ultramicro-determination of C and H with samples of 0.1—0.3 mg, when, with the use of 0.01 N thiosulfate, acceptable analytical results are uniformly obtained.

The third part of the paper discusses a new form of conducting the micro-*Dumas*-method for substances that burn with difficulty. Its principle is that the sample in a platinum boat, is burned over copper oxide in a stream of moist carbon dioxide and oxygen. The gas mixture is led over heated copper at the far end of the combustion tube. The excess oxygen is thus removed quantitatively. The free nitrogen is collected as formerly in an azotometer over caustic potash and measured.

The essential feature of this procedure is that free oxygen is available at all times during the analysis of difficultly combustible nitrogenous materials, and this makes complete burning of the sample possible. The water carried along by the gas from the oxygen generator has a favorable effect on the combustion process, since the conditions are thus provided for the gasification of the residual carbon. The constant automatic regeneration of the copper oxide eliminates the usual refilling of the tube after each analysis, so that the combustion tube can be kept at the prescribed temperature without interruption and all parts of the apparatus, including the azotometer, remain permanently connected with each other during a series of analyses.

To produce the CO_2-O_2 gas current, carbon dioxide from dry ice is led through a flask containing 30% hydrogen peroxide. The accuracy is $\pm$ 0.2% relative-U-error. The time required for an analysis is about 25 minutes.

The procedure has been in daily use for three years, and has proved satisfactory for both difficultly combustible materials and also in the macromethodology.

The combustion of the sample, in the determination of oxygen, in the new C-H-procedure and in the new described form of the *Dumas* method, is carried out automatically by means of a gas burner which is moved along by a synchronous motor. It is planned, at some future date, to give a detailed account of these three procedures in this journal, and to include all the necessary information for their application in practice, with due consideration of the acquired experiences.

Résumé.

Dans une première partie, on donne une vue d'ensemble des expériences de ces dix dernières années relatives à la pratique sur des corps témoins du microdosage iodométrique de l'oxygène. Le principe de la méthode et l'appareillage sont expliqués au moyen d'un schéma. L'appareil permet le dosage en semimicro, en micro ou le dosage de traces. Pour le dosage de l'oxygène combiné il faut de 3 à 5 mg, pour les traces, 20 mg ou plus. La précision du premier comporte une erreur relative U de $\pm$ 0,2% et celle des dernières, une erreur relative X de $\pm$ 2%. Cet appareil permet l'introduction de dosages ultramicro avec une prise d'essai de 0,3 mg de substance pour laquelle on peut titrer avec le thiosulfate 0,01 N. Une analyse en série dure 30 minutes. La méthode permet le dosage de l'oxygène dans les matières organiques et dans les matières minérales dont l'oxygène, dans les conditions stipulées, est quantitativement séparable par voie thermique. La présence du fluor et du phosphore gêne. Le domaine d'utilisation a pu, par addition de substances convenables exemptes d'oxygène (bases induliques) être étendu aussi à des sels et oxydes tel que le métal fut réductible par le charbon.

La méthode décrite se distingue par un «témoin entièrement libre» qui dans notre procédé, forme par principe, la condition préalable de la mise en route de l'appareil. Sous cette expression nous entendons dans notre esprit que par exécution d'une analyse complète sans substance, la solution à titrer, après addition d'empois d'amidon, *reste au moins une minute complètement incolore.*

On discute en outre des causes d'erreur déjà observées qui peuvent amener les témoins et de la manière de les éviter. Comme telles, viennent en considération: 1° Emploi de réactifs de pureté insuffisante comme le gaz de balayage, le liquide du compte-bulles, le charbon de contact, l'anhydride iodique, le brome, l'acétate de potassium et de sodium, l'eau, etc. (faire le contrôle des réactifs). 2° Inconstance de la température du contact sur charbon, qui ne doit pas dépasser $\pm$ 5° C. Pour aller plus loin dans la réalisation de la constance de température, il faut apporter plus de soin. 3° Emploi de tubes à réaction insuffisamment propres ou à interne altérée. Avant l'emploi, chaque tube à réaction doit être traité par l'acide fluorhydrique à 40%; au bout de 400 à 500 analyses, interviennent, en général, des essais ratés probablement dus à la réaction du charbon sur les objets de quartz et qui sont accompagnés de points blancs à la surface interne des tubes. Ces phénomènes qui indiquent la limite de fonctionnement des tubes s'observent aussi parfois sur des tubes neufs non traités par l'acide fluorhydrique, de même que par la surchauffe.

Dans la deuxième partie, on décrit un nouveau procédé issu du dosage de l'oxygène pour effectuer le microdosage de C et H. Pour cela, on brûle la substance sur l'oxyde de cuivre, dans un courant d'oxygène. Ce dernier gaz

qui est en excès, se sépare quantitativement des produits de la combustion, eau et gaz carbonique, à 550° C environ sur le cuivre chauffé. Le courant gazeux, dans le but de l'absorption de l'eau est dirigé sur du chlorure de baryum déshydraté, tandis que le gaz carbonique, d'après le principe du dosage de l'oxygène, est réduit en oxyde de carbone sur le contact de charbon; cet oxyde réagit sur l'anhydride iodique et titré d'après l'iode produit.

Avec des coefficients analytiques convenables, on peut atteindre pour C et aussi pour H, une précision meilleure que celle déjà connue. Pour cela, le témoin entièrement libre et la netteté du virage iodométrique sont d'influence décisive. Les valeurs trouvées pour des pesées de 4 mg ne s'écartent des valeurs calculées que de quelques centièmes pour cent. Procédé et appareillage permettent l'introduction de l'ultramicro du carbone et de l'hydrogène avec prises de 0,1 à 0,3 mg, pour lesquelles, on peut obtenir des résultats utilisables, en général, avec du thiosulfate 0,01 N.

La troisième partie traite d'une nouvelle forme d'exécution du micro-*Dumas* pour les substances difficiles à brûler. Le principe consiste à détruire la substance pesée dans une nacelle de platine au contact d'oxyde de cuivre dans une atmosphère de gaz carbonique-oxygène. Le courant gazeux passe au bout du tube à combustion sur du cuivre chauffé; l'excès d'oxygène est ensuite quantitativement éliminé et l'azote libéré est recueilli comme précédemment dans un azotomètre, sur la potasse et dosé.

L'intérêt du procédé réside dans le fait qu'à chaque coup d'oeil sur l'analyse pour la combustion des substances azotées difficilement brûlables, il reste de l'oxygène libre disponible, ce qui rend possible la combustion sans résidu. L'eau entraînée du récipient à oxygène par le courant gazeux réagit favorablement sur le processus de la combustion pourvu que soient données les conditions pour le dégazage du charbon résiduel. Par la régénération automatique continuelle de l'oxyde de cuivre on n'a pas besoin d'un nouveau remplissage après chaque analyse, de sorte que le tube à combustion est maintenu sans interruption au voisinage de la température prescrite et toutes les parties de l'appareil, y compris l'azotomètre, restent associées pendant toute la durée d'une série d'analyses.

Pour la production du courant CO_2-O_2, le gaz carbonique provient de carboglace et se dirige dans un flacon à eau oxygénée à 30%. La précision atteint $\pm$ 0,2%; la durée est de 25 minutes. Le procédé est déjà depuis 3 ans en usage journalier et a conservé sa réputation aussi bien pour les substances difficilement combustibles que dans le procédé de la macrométhode.

La combustion de la substance pour le dosage de l'oxygène, le nouveau dosage C-H et la modification de la méthode de *Dumas* a lieu automatiquement avec un brûleur à gaz mis en marche par un moteur synchrone.

On a l'intention de donner dans cette revue, une description détaillée des trois procédés mentionnés avec les indications nécessaires pour l'usage pratique en tenant compte des expériences accumulées.

Diskussion.

H. *Wiesenberger* (Graz, Österreich): Ist es nötig, das zur Wasseradsorption verwendete Bariumchlorid mit Kohlendioxyd zu sättigen und ist es nie vorgekommen, daß Kohlendioxyd vom Bariumchlorid in geringer Menge festgehalten wurde? Wurden bereits schwer verbrennliche Substanzen, die in Luft verbrannt meist in Luft unverbrennliche Kohlenstoffrückstände hinterlassen, analysiert?

H. *Unterzaucher*: Bariumchlorid wird in so reiner Form geliefert, daß eine Vorbehandlung des Präparates nicht nötig war. Auch wurde Festhalten von Kohlendioxyd niemals beobachtet. — Es wurden bisher nur wenige Substanzen geprüft, um festzustellen, ob im Prinzip die neue Methode brauchbar ist.

H. *Bischoff* (Graz, Österreich): Haben Sie versucht, die mit Kohlenstoff gefüllten Quarzröhren durch Röhren aus Metall oder Korund zu ersetzen?

H. *Unterzaucher*: Solche Versuche werden verfolgt, aber es wird nicht leicht sein, das richtige Material zu finden.

H. *P. Gouverneur* (Amsterdam, Holland): Beim Nacharbeiten der Methode zur direkten Sauerstoff-Bestimmung erhalten wir immer einen niedrigen, aber dauernden Blindwert. Wir sind zum Schluß gekommen, daß dieser durch eine langsame Abgabe von Sauerstoff hervorgerufen wird, der offenbar fest an Kohle gebunden, vielleicht adsorbiert ist. Der Blindwert ist beim normalen Arbeiten nicht störend. Ich möchte auch bemerken, daß wir zwischen den beiden Beendigungsvorgängen eine deutliche Differenz beobachtet haben. Wenn bei der Analyse von Kohlenwasserstoffen der jodometrische Vorgang benützt wird, so erhielten wir regelmäßig zirka 0,6% Sauerstoff, obgleich nicht mehr als 0,1% anwesend war. Der Fehler tritt aber nicht auf, wenn die Analyse gravimetrisch beendet wird (Wägung des Kohlendioxyds). Es wird angenommen, daß der Fehler durch die Instabilität des benutzten Jodpentoxyds gegen Wasserstoff hervorgerufen wird, der in großen Mengen im Pyrolysegas der Kohlenwasserstoffe vorhanden ist.

H. *Unterzaucher*: Der Erscheinung eines dauernden, wenn auch niedrigen Blindwertes, der sich durch langsame Abgabe von sehr fest an Kohle gebundenem Sauerstoff herleitet, sind wir in unserer Praxis nicht begegnet. Eine solche Sauerstoffabgabe sollte erwartungsgemäß immer geringer werden und einmal ganz aufhören. Möglicherweise handelt es sich nur um eine Verunreinigung der Kohlefüllung oder um die erwähnte Blindwertquelle bei Rohren, die vor dem Gebrauch nicht mit 40%iger Flußsäure behandelt worden sind. Zweckmäßig wäre auch die Überprüfung der Dichtheit der Zuleitung von der Stahlflasche bis zum Reaktionsrohr sowie die Reinheitsprüfung des Transportgases. Die gravimetrische Endbestimmung haben wir in unserer Praxis nie verwendet, da wir mit der maßanalytischen in allen Fällen auskommen konnten. Wenn bei Anwendung der letzteren höhere Sauerstoffwerte erhalten werden als nach dem gravimetrischen Verfahren, dann ist wahrscheinlich das verwendete Jodpentoxyd nicht von einwandfreier Beschaffenheit oder es liegt ein Fehler bei der maßanalytischen Jodbestimmung vor. Nach unseren Versuchsergebnissen ist die Reaktionsfähigkeit des Jodpentoxydes mit Wasserstoff von der Oberflächenbeschaffenheit abhängig. Feste harte Kristalle, wie sie durch Umkristallisieren aus starker Salpetersäure erhalten werden, zeigen geringere Reaktionsfähigkeit als das leicht zerreibbare, käufliche Jodpentoxyd.

H. Prof. *Lieb* (Graz, Österreich): Wurden zur Bereitung der Einwaagen von Zehntelmilligrammen auch Ultramikrowaagen verwendet? Ist die Anschaffung der beschriebenen Apparaturen bereits möglich, und wenn ja, zu welchem Preis?

H. *Unterzaucher*: Für Substanzeinwaagen von 0,1 bis 0,3 mg ist zur Erreichung hinreichender Genauigkeit eine Ultramikrowaage erforderlich, die es gestattet, die Tausendstel-Milligramme abzulesen und die Zehntausendstel zu schätzen. Für die Waagenbaufirmen erwächst hiermit eine neue und wichtige Aufgabe, die, wie mir versichert wurde, unmittelbar in Angriff

genommen werden soll. Nach privater Mitteilung von *J. A. Kuck*, City College of New York, ist eine solche Ultramikrowaage dort bereits in Gebrauch. Was die Beschaffung unserer Mikrostickstoff-, Mikrosauerstoff- und der neuen Mikro-C-H-Apparatur anlangt, ist zu sagen, daß von Seiten einiger Apparatebaufirmen lebhaftes Interesse besteht und die Möglichkeit der Herstellung erörtert wurde. Wie die Apparate-Ausstellung im Studentenhaus zeigte, ist bereits Beachtliches geleistet worden. Es ist jedoch zu hoffen, daß die Apparaturen in engerer Anlehnung an die einfachere Ausführung unserer Original-Apparaturen zu einem für einen größeren Interessentenkreis (Universitäts-Institute) erschwinglichen Preis hergestellt werden können.

H. *W. Kirsten* (Uppsala, Schweden): Herr Dr. *Unterzaucher* berichtet in seiner ersten Veröffentlichung über die Sauerstoff-Bestimmung, daß in dem Kaliumhydroxyd-Rohr eine rote Verfärbung auftritt, die im Laufe der Analysen weiter fortschreitet. Wir haben diese Verfärbung gleichfalls bemerkt. Bei der Ausarbeitung unserer Schwefelbestimmungs-Methode haben wir einen ähnlichen roten Beschlag unter ähnlichen Umständen erhalten und nachweisen können, daß es sich um rotes Silicium handelte, das durch Reduktion von Quarz entstand. Es erscheint uns deshalb wahrscheinlich, daß der bei der Sauerstoff-Bestimmung entstehende rote Beschlag — der leider für die qualitative Analyse zu gering war — auch aus rotem Silicium besteht.

H. *Unterzaucher*: Eine leichte Rotfärbung des verwendeten Kaliumhydroxyds ist in unserer Praxis der Sauerstoff-Bestimmung dann und wann festgestellt worden. Während diese jedoch verhältnismäßig selten auftrat, konnte nach längerem Gebrauch regelmäßig im kapillaren Ende des Reaktionsrohres die Bildung eines roten Belages beobachtet werden. Ob es sich in beiden Fällen um ein und denselben Stoff handelt und woraus dieser besteht, ist noch nicht untersucht worden. Für die Blindwertfreiheit ist die Erscheinung ohne Belang.

H. *W. Kirsten*: Wir haben nicht nur bei der Sauerstoffbestimmung, sondern auch bei der Ausarbeitung unserer Schwefelbestimmungs-Methode einwandfrei festgestellt, daß Quarz bei der Temperatur von 1100° C merkbar flüchtig ist. Die Quarzdämpfe werden in der Kohle reduziert, was einen Blindwert verursachen muß. Herr Dr. *Unterzaucher* berichtet, daß die Reinigung des Quarzrohres mit Flußsäure Blindwerte beseitigt. Da eine unbedeckte Quarzwand bei der verwendeten Temperatur ohne Zweifel Quarzdämpfe abgibt, möchte ich zur Diskussion stellen, ob bei dieser Behandlung nicht etwa eine Schutzschichte gebildet wird, die die Quarzwand vor Verflüchtigung schützt.

H. *Unterzaucher*: Ob es sich bei der Behandlung des Quarzrohres mit 40%iger Flußsäure um die Bildung einer Schutzschichte handelt, die die Quarzwand vor Verflüchtigung schützt, vermag ich nicht zu sagen. Dagegen spricht jedenfalls der Umstand, daß wir lange Zeit einwandfrei mit Rohren arbeiten konnten, die nicht mit Flußsäure vorbehandelt worden waren. Nach unseren Beobachtungen scheint es wahrscheinlicher, daß es sich bei der Flußsäurebehandlung um die Entfernung einer bei der hohen Temperatur des Blasens gebildeten Oberflächenschichte handelt, deren Material der Reaktion mit Kohlenstoff leichter zugänglich ist, als das blanke Quarzmaterial. Für diese Annahme spricht auch der Umstand, daß die Mengen des bei der Flußsäurebehandlung anfallenden weißen Pulvers bei den einzelnen Rohren ganz verschieden sind und, auffallenderweise, manchmal ganz fehlen. Es ist daher naheliegend anzunehmen, daß Rohre, die bei der Flußsäurebehandlung keinen weißen Niederschlag ergeben, auch ohne solche Behandlung

einwandfrei brauchbar sind, was unseren erwähnten diesbezüglichen Erfahrungen mit nicht vorbehandelten Rohren entsprechen würde.

H. *H. P. A. Groll* (Göteborg, Schweden): Sind auch die durch Überhitzung unbrauchbar gewordenen Quarzrohre durch Flußsäurebehandlung wieder brauchbar zu machen? Es wäre besonders interessant festzustellen, ob etwa störende Verunreinigungen im Innern der Quarzmasse vorhanden sind, welche durch bloße Wärmewirkung an die Oberfläche herausdiffundieren. Oder ist der Effekt ausschließlich auf die Gegenwart von Kohle, bzw. einer reduzierenden Atmosphäre zurückzuführen?

H. *Unterzaucher*: Versuche, durch Überhitzung unbrauchbar gewordene Rohre durch Flußsäurebehandlung wieder brauchbar zu machen, sind von uns nicht gemacht worden, da wir in unserer Praxis jede Überhitzung vermeiden. Durch längeren Gebrauch unbrauchbar gewordene Rohre konnten durch Flußsäurebehandlung nicht wieder brauchbar gemacht werden. Über eventuelle Verunreinigungen der Quarzmasse und deren Effekte liegen unsererseits keine Versuchsergebnisse vor. Auch über das Verhalten von Quarzrohren ohne Gegenwart von Kohle sind in diesem Zusammenhang keine Versuche gemacht worden.

H. *A. Haack* (Wien): Ist das Unbrauchbarwerden der Quarzrohre nach längerem Gebrauch durch deren „Entglasung" verursacht?

H. *Unterzaucher*: Was die Untersuchung von Quarzrohren, die schon durch längeren Gebrauch infolge „Entglasung" und dergleichen unbrauchbar geworden sind, anbetrifft, sind von uns nur Versuche durch Behandeln mit 40%iger Flußsäure in der für neue Rohre geschilderten Weise gemacht worden. Es ist jedoch nicht gelungen, solche mit einem Blindwert behaftete Rohre wieder verwendungsfähig zu machen. Nach unseren Erfahrungen hat es jedoch den Anschein, daß ein feiner Belag schwer verbrennlicher, graphitischer Kohle an der inneren Rohrwandung einen Schutz für die Quarzoberfläche darstellt und die Lebensdauer der Rohre verlängert. Wir verwenden daher auch für die Analyse organischer Metallsalze möglichst keine neuen Rohre, deren Oberfläche noch keinen Kohlebelag aufweist. Die Untersuchung der Vorgänge und Veränderungen an der Quarzoberfläche wäre sehr wünschenswert und zweckmäßig.

Literatur.

[1] *M. Schütze*, Z. analyt. Chem. **118**, 245 (1939).

[2] *J. Unterzaucher*, Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 391 (1940).

[3] *F. Pregl*, Quantitative organische Mikroanalyse, 5. Auflage, neubearbeitet von Dr. *H. Roth*, Springer-Verlag Wien. 1947.

[4] *F. Pregl*, Quantitative organische Mikroanalyse, 5. Auflage, neubearbeitet von Dr. *H. Roth*, Springer-Verlag Wien. 1947. S. 139.

[5] *H. Gysel*, Helv. chim. Acta **22**, 1088 (1939).

[6] *J. Unterzaucher*, Chemie-Ingenieur-Technik, **22**, 39 (1950).

[7] *J. Unterzaucher*, Erfahrungen m. d. Mikrosauerstoffapparatur im tägl. Betrieb; unveröfftl. Vortrag, gehalten b. d. Arbeitstagung für Mikrochemie, München, 13.—14. März 1942.

[8] *J. Lindner*, Mikromaßanalytische Bestimmung des Kohlenstoffes und Wasserstoffes mit grundlegender Behandlung der Fehlerquellen in der Elementaranalyse. Verlag Chemie, Berlin 1935. S. 183.

[9] *J. Lindner*, l. c. S. 133.

[10] *M. Boetius*, Über die Fehlerquellen b. d. mikroanalytischen Bestimmung des Kohlenstoffes und Wasserstoffes. Verlag Chemie, Berlin 1931.

[11] *J. Unterzaucher*, Chemie-Ingenieur-Technik, **22**, 128 (1950).

Chemical Institute, Faculty of Science, Tokyo University.

Application of a New Oxidizing Reagent — "Silver Peroxide" — in Microanalysis.

By

Kenjiro Kimura and **Yukio Murakami.**

(Received July 18, 1950.)

I. Introduction.

As the presence of oxidizing reagents is absolutely indispensable in certain cases of chemical analysis, the importance of producing a new and more powerful oxidizing reagent to overcome several of the defects and difficulties encountered during the processes of analysis, is self-evident. One of such new and powerful oxidizing reagents is described in this report.

Obviously the power of an oxidizing reagent is to be credited to its latent normal oxidation potential, and when observed from this point fluorine, atomic oxygen and ozone[1] can be cited as the most powerful of such reagents. They have their drawbacks, however, in their difficulty of manipulation for routine works, which account for preferred use of compounds lower in their normal oxidation potential. On the occasion of determining manganese in biological materials by permanganate coloration, the authors thoroughly investigated the properties of the oxidizing reagents. It was during this study that the mechanism of the oxidation reaction of ammonium persulphate attracted the authors' attention. Several elements were suggested by many workers as the catalyst for this reaction, and among them silver nitrate[2] was selected as the best from the standpoint of effectiveness and practicality. Yet the astonishingly small quantity of silver nitrate required at times for complete reaction, led to doubt as to whether its action should be dismissed as merely catalytic. Thus, *Barbier*[3] presented a report concluding the presence of an intermediate compound $3\,Ag_2O_2 \cdot AgNO_3$ as responsible for the oxidation reaction, while *Pinkus*[4] suggested the formation of silver peroxide in the solution which vigorously oxidizes the manganese

ion to permanganate ion though the extraction of silver peroxide in stable state could not accomplished. This contribution was suggestive in preparing our new energetic oxidizing reagent from silver nitrate and ammonium persulphate, both commonly used chemicals in routine works.

The composition of this new reagent is not definitely known. It appears to be a mixture of silver peroxide and silver persulphate varying in proportion to the lapse of time after its preparation. For convenience and simplicity the authors call this reagent "silver peroxide". A detailed study of its properties is being carried on and will be reported in the near future.

The first successful application of this reagent made in the oxidation of manganese proved it worthy of its expectation. Its superior power was found to be comparable with reagents of normal oxidation potential stronger than ammonium persulphate in the presence of silver ion in an acidic medium. It was examined further in the volumetric determination of cerium by the authors, and in the colorimetric determination of chromium by *M. Tanaka*, competent co-worker in our laboratory, and in both cases remarkable results were revealed. Its use has successfully overcome several of the defects noticed in the use of other oxidizing reagents and has at the same time contributed to the simplicity and accuracy of operation.

II. Preparation of Silver Peroxide.

When a slight excess of ammonium persulphate is cautiously added to a 10 per cent solution of silver nitrate with constant stirring, a heavy precipitate soon separates out and the supernatant liquid becomes tinged brown. This grey precipitate is considered to be a mixture of silver peroxide and silver persulphate while the brown liquid is a nitric acid solution of silver peroxide from which silver peroxide may be precipitated when diluted. It is washed several times with water by decantation until no acid reaction appears and is then transferred to an amber colored glass bottle with glass stopper together with some water. It is desirable to keep this in a dark, cool place. A freshly precipitated silver peroxide may darken in color on standing though this change does not reduce its oxidizing power in any degree. On the contrary it has a desirable property as it quickens the decomposition of the excess reagent at low temperature. This eliminates the necessity of heating as described below, and makes it exceedingly convenient in actual work. Though the mechanism of its formation is not clear, it is believed to follow the equation[5]:

$$Ag_2S_2O_8 + 2\,H_2O = Ag_2O_2 + 2\,H_2SO_4.$$

Table 1. Time required for complete decomposition at various temperatures.

Lapse of time after preparation (days)	92.5°	70°	60°	50°	40°	20°	10°
	min.						
2	3	9	13	24	45	—	—
13	2	—	3	—	6	10	—
21	2		2		3		8

Another striking property of this new reagent is that its oxidizing power is retained for approximately five months or more after its preparation without the slightest decrease its oxidizing power.

Table 2. Oxidizing power and the duration after preparation.

Duration after preparation (days)	1	7	14	21	28	67	148
MnO found (γ)	104.1	104.2	104.0	104.1	104.1	103.9	104.2

The tested solution contains 140.0 γ MnO in 25 ml solution acidified with sulfuric acid.

III. New Colorimetric Determination of Manganese with Silver Peroxide.

A minute amount of manganese can be determined quickly and accurately by the colorimetric method owing to the ease with which manganese ion is oxidized to permanganate. Several oxidizing reagents which were proposed for this purpose by many workers. Lead peroxide was proposed by *Crum*[6], sodium bismuthate by *Reddrop* and *Ramage*[7], ammonium persulphate in the presence of silver nitrate by *Marshall*[8], nickel dioxide by *Lang*[9], alkali periodate by *Willard* and *Greathouse*[10] and the use of ozone was recently recommended by *Willard* et al.[1].

Though the above mentioned reagents are undoubtedly both useful and effective among those proposed up to this time, none of them can be recommended as exceeding all others in its accuracy or simplicity. This is due to the weaknesses in each of the methods prescribed which set back its merits to a point where one method is just as good or just as bad as the others[10, 11]. For instance the difficulty of removing the excess reagent will be encountered in some, and time-consuming, complicated and exhaustive operations in others. And there is also the difficulty of securing a reagent of good quality which can be trusted to produce accurate results as well as the difficulty of securing it at a cost low enough to use it freely in routine works[12].

a) Quantity Required and Removal of Excess Reagent.

It is convenient to handle about 0.1 to 0.15 g with a glass rod flattened at one end. (Call this one unit.) About 100 γ MnO is sufficiently oxidized by one unit. Only two units are required for the adequate oxidation of about 800 γ MnO. If the concentration of MnO is more than 10 p. p. m., a violet precipitate is sometimes formed. It is therefore preferable to determine manganese as MnO at less than 10 p. p. m. The addition of the reagent darkens the solution but it soon becomes clear and maximum coloration is obtained by warming on a water bath or by letting the solution stand for several minutes. The reagent should not in any case be added to a hot solution as oxidation will no doubt be insufficient.

When the influence of sulfuric acid concentration on the reagent was examined, it was found that a concentration ranging from 8 to 12% produces the best results.

b) Accuracy and Conformity to *Beer*'s Law.

Oxidation of manganese in various concentrations can be performed by closely following the directions outlined below. The extinction coefficients of solutions oxidized by silver peroxide were measured by *Pulfrich* photometer using the filter S 53 (see Table 3). It can be noticed from these results that it adheres fairly close to *Beer*'s law.

Table 3. Extinction coefficients of the solutions after oxidation of manganese by silver peroxide.

Manganese as MnO in p. p. m.	2.80	4.16	6.24	8.32
No. 1 (average of eight readings).....	0.2002	0.4039	0.6043	0.8048
No. 2 (average of eight readings).....	0.2009	0.4028	0.6034	0.8057
No. 3 (average of eight readings).....	0.2008	0.4013	0.6052	0.8059
No. 4 (average of eight readings).....	0.2018	0.4041	0.6044	0.8049
No. 5 (average of eight readings).....	0.2022	0.4017	0.6043	0.8056
Average	0.2012	0.4028	0.6037	0.8052

Filter: S 53, length of the cell: 30.04 mm.

With these data the relation between concentration and extinction coefficient can be calculated by application of the method of least squares where X stands for the concentration of manganese as MnO in p. p. m., and E for the extinction coefficient of the length of 10.00 mm cell used.

$$X = 3.439\,E. \qquad \text{(a)}$$

To identify the deviation from its true value, the extinction coefficient of the permanganate solution at the same acidity (b) and the extinction coefficient of the permanganate solution treated in the same way with

silver nitrate (c) were measured, and the relation between X and E is obtained in the same way:

$$X = 3.435\,E, \qquad \text{(b)}$$

$$X = 3.439\,E. \qquad \text{(c)}$$

The results thus obtained correspond with one another in a permissible range of error, proving that silver peroxide has no obstructive effect during the process of oxidation and in securing maximum coloration.

c) Interference of Foreign Ions.

Although information has not been given on any interference encountered by the use of silver peroxide, it was nevertheless thoroughly tested with most of the familiar ions commonly met during routine works. Some of the ions are definitely known as non-interfering in this colorimetry. As a result of this test, the ions can be divided into three groups: (1) Non-interfering ions, (2) colored ions and (3) ions precipitated by silver ion, sulphate ion or by an acid medium. Some of the results are shown on Table 4 and Table 5.

Table 4. Ions which have no interfering effect.

Ions	Salt used	Amount present (mg) (against 104,0 γ MnO)		MnO found (γ)	Difference (γ)
Al	$Al_2(SO_4)_3$	Al	100 (1 : 1000)	103.8	— 0.2
As	As_2O_3	As_2O_3	100 (1 : 100)	103.8	— 0.2
NH_4	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4	100 (1 : 1000)	103.8	— 0.2
Bi	$Bi(NO_3)_3$	Bi	10 (1 : 100)	104.0	0
Ca	$Ca(NO_3)_2$	Ca	10 (1 : 100)	104.0	0
Cd	$Cd(NO_3)_2$	Cd	100 (1 : 1000)	103.6	— 0.4
Fe	$Fe(NO_3)_2$	Fe	100 (1 : 1000)	104.0	0
Mg	$MgSO_4$	Mg	100 (1 : 1000)	103.4	— 0.6
Sn	$Sn(SO_4)_4$	Sn	100 (1 : 1000)	103.9	— 0.1
Tl	Tl_2SO_4	Tl	10 (1 : 100)	103.3	— 0.7
Zn	$ZnSO_4$	Zn	100 (1 : 1000)	103.6	— 0.4
VO_3	NH_4VO_3	V_2O_3	10 (1 : 1000)	104.2	+ 0.2
BO_2	$Na_2B_4O_7$	B_2O_3	100 (1 : 1000)	103.7	— 0.3
MoO_4	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\,4\,H_2O$	MoO_3	140 (1 : 1400)	104.2	+ 0.2
PO_4	Na_2HPO_4	P_2O_5	1000 (1 : 10.000)	104.0	0
SiO_3	Na_2SiO_3	SiO_2	5 (1 : 50)	104.1	+ 0.1
F	NaF	F	0,16 (1 : 1,6)	104.0	0
NO_3	HNO_3	NO_3	2,8 (1 : 28)	104.0	0
PO_4	H_3PO_4	P_2O_5	1500 (1 : 15.000)	104.4	+ 0.4
C_2O_4	$(COONa)_2$	C_2O_4	14 (1 : 140)	104.2	+ 0.2
$C_4H_4O_6$	$NaKC_4H_4O_6$	$C_4H_4O_6$	5 (1 : 50)	103.8	— 0.2

(1) Non-interfering ions: As would be expected the commonly known ions do not interfere with this colorimetric determination. However,

the presence of a specially large quantity of ferric ion interferes with the process, but this interference can easily be prevented by a complex formation on the addition of some phosphoric acid. Some reducing ions such as ferrous, sulfite, nitrite, oxalate, tartrate and other ions which can be oxidized, if present in the solution in only small amounts, can be readily oxidized by the further addition of silver peroxide. But it is much safer and recommendable in such cases to remove or destroy them by evaporation with nitric acid or a mixture of nitric acid and sulfuric acid before oxidation is attempted.

Table 5. Colored ions and ions precipitated in the procedure.

Ions	Salt used	Amount present (mg.) (against 104.0 γ MnO)		MnO found (γ)	Difference (γ)	Remarks
Cr	Chrome-alum	Cr	10 (1 : 100)	103.2	— 0.8	after oxidation with Na_2O_2
Cr_2O_7	K_2CrO_4	Cr	10 (1 : 100)	104.1	+ 0.1	
Cu	$CuSO_4$	Cu	100 (1 : 1000)	104.2	+ 0.2	
Cu	$CuSO_4$	Cu	100 (1 : 1000)	104.3	+ 0.3	isolated as CuS
Nd	$Nd(NO_3)_3$	Nd_2O_3	50 (1 : 500)	104.6	+ 0.6	
Ni	$NiSO_4$	Ni	50 (1 : 500)	104.5	+ 0.5	acid concentration 25%
Ti	$Ti(OH)_4$	TiO_2	10 (1 : 100)	104.0	0	added 10 units $Nd(NO_3)_3$ containing other rare earths the comparison solution must be treated with silver peroxide in the same way as a sample
rare earths	nitrate	about	50 (1 : 500)	103.8	— 0.2	
Co	$CoSO_4$	Co	10 (1 : 100)	104.3	+ 0.3	
Ba	$Ba(NO_3)_2$	Ba	100 (1 : 1000)	104.6	+ 0.6	
Sr	$Sr(NO_3)_2$	Sr	100 (1 : 1000)	104.0	0	
Hg_2	$Hg_2(NO_3)_2$	Hg	100 (1 : 1000)	103.8	— 0.2	
Cl	NaCl	Cl	100 (1 : 1000)	103.8	— 0.2	
Pb	$Pb(NO_3)_2$	Pb	100 (1 : 1000)	104.0	0	
Ca	$Ca(NO_3)_2$	Ca	100 (1 : 1000)	103.7	— 0.3	alcohol is added to decrease the solubility
Ca	$Ca(NO_3)_2$	Ca	50 (1 : 500)	104.1	+ 0.1	isolated as oxalate
SiO_3	Na_2SiO_3	SiO_2	100 (1 : 1000)	103.8	— 0.2	separated as insoluble SiO_2
SiO_3	Na_2SiO_3	SiO_2	100 (1 : 1000)	104.3	+ 0.3	SiO_2 filtered off after treating with H_2SO_4
WO_4	Na_2WO_4	W	100 (1 : 1000)	104.1	+ 0.1	digested with HNO_3 and filtered

(2) Colored ions: Although some interference is to be expected in the presence of colored ions, adverse effects from copper, nickel, cobalt, titanium, etc. can be eliminated by the use of an aliquot portion of the sample solution in the reference cell or by the addition of the same amount to the comparison solution. Inasmuch as these interferences are not caused by the usual procedure, it need not be considered fatal.

(3) Ions precipitated by silver ion, sulfate ion, or by an acid medium: Interferences in these cases can be dismissed readily by either filtration or the application of usual methods of elimination. If the amount of chloride present is small, it can be removed as silver chloride though it should be safer to do so by evaporation with sulfuric acid especially if the sample contains a small amount of manganese.

d) General Procedure.

Add sulfuric acid and evaporate till it fumes if the sample solution contains any considerable amount of chloride. In the presence of a large quantity of ferrous ion and other substances that will be oxidized, however, boil with nitric acid before evaporating with sulfuric acid. As many workers have recommended, the best method of separating chromium involves its oxidation in the basic solution wherein manganese is precipitated with iron, titanium and others. In similar manner it is possible to separate other undesirable materials just as easily without interfering effects. To concentrate very small amounts of manganese as in the case of hot spring or natural water (as little as 10 γ per liter), it is most convenient to apply hydroxide formation method with a little ferric salt as a collector.

The solution thus obtained, ready for analysis, should contain 10 per cent sulfuric acid in this final step. Then add about 0.1 g silver peroxide while stirring constantly. Next, heat on a water bath for two minutes or else let it remain standing for several minutes so that maximum color will be developed. Dilute to a definite volume and proceed with the color comparison in any convenient way.

The significance of this method lies in the possibility of determining as little as 1 p. p. m. of manganese with ease and with the best of results.

IV. Extent of Application.

The above given outline clearly indicates the many respects in which this new oxidizing reagent excels hitherto used reagents in power of oxidation, in simplicity of manipulation, and in time required, without the slightest sacrifice in its accuracy. The determination of manganese with this new reagent in biological matters, silicate rocks, natural water, hot spring water, etc. has already been tried by several workers in Japan with satisfactory results. To give further examples of the extent to

which this new reagent can be used in analytical chemistry for oxidation purposes of unique nature, it should be added that successful results were obtained, in a study of colorimetric determination of manganese in field works conducted by *M. Tanaka*[13], in chemical prospecting of manganese mine by *M. Shima*[14] and in the study of manganese content in hot springs contucted by *M. Tanaka* and the junior author[15]. These studies are scheduled for publication in the Journal of the Chemical Society of Japan or the Bulletin of the Society. The remarkable results obtained in the above applications contribute facts to stress the superiority of silver peroxide as a vigorous oxidizing reagent. Its special property is particularly appreciated in the process of obtaining maximum coloration of permanganate without the presence of heat. This remarkable property cannot be expected in any other oxidizing reagents and is most convenient in field work.

Note must be made of the fact that if determination of manganese in natural water or hot springs water is carried out after a considerable lapse of time, the results obtained incline toward a slightly lower value than their real value. This error can clearly be understood to be due to the reason that manganese is carried down with iron hydroxide formed by the expulsion of bicarbonate ions and the oxidation by the air. This serious defect can be thoroughly removed by using this reagent. Some results will be shown in Table 6.

Table 6. The comparison of the results obtained in field with the results by the usual way.

Sample Ikaho hot springs	pH	Mn (obtained in field) mg/l	Mn* (obtained by the usual way) mg/l
Source No. 1	6.1	2.06	0.006
,, ,, 2	6.1	1.22	0.250
,, ,, 3	6.6	1.73	0.023
,, ,, 4	6.8	1.32	not detected

* Manganese was determined in the laboratory after the precipitation of iron.

As already reported in part[15], corrected values of the manganese content in hot springs, especially in hot springs with p_H larger than 6,0, will be supplied by the authors in the near future.

V. Volumetric Determination of Minute Amounts of Cerium with "Silver Peroxide".

Cerium is significant in being the only element of the rare earth group to be determined volumetrically by oxidation without the need

of separation from the neighboring elements. And for this oxidation, many reagents have been proposed by several workers since the introduction of lead peroxide for this task. Hence it is an oxidation-reduction titration which is widely used in analysis.

The generally approved *Knorr*'s modified method[16] of cerium determination with persulfate and *Metzger*'s method with sodium bismuthate[17] were applied by the authors on the occasion of investigating minute amounts of cerium. But these methods failed to give satisfactory results. It had been noticed that *Autié*[18] and *Weiss* et al.[19] had, on the basis of a comparative study, respectively reported on the defects of these methods in one respect or another and had recommended other ways of cerium determination. Their recommandations, however, are all for the use in a standard cerium solution containing more than 100 mg and are not applicable in determining minute amounts of cerium such as in the authors' investigation. The source of error in these methods definitely is due to the difficulty of securing a perfect oxidation and a complete elimination of the excess oxidizing reagent.

The remarkable success obtained in the colorimetric determination of minute amounts of manganese with silver peroxide directed the anticipation of obtaining equally successful results for determining small amounts of cerium as is evident from the similarity of their normal oxidation potentials, 1,50 volts from manganese (II) to manganese (VII) and 1,45 volts from cerous to ceric state[20].

a) Preliminary Experiments.

The preliminary experiments showed that silver peroxide can oxidize a great quantity of cerous salt in a sulfuric acid solution. The amount required to oxidize 5 mg of cerium is only one unit (about 0,1 g handled on the flattened end of a glass rod), and the most appropriate sulfuric acid concentration is 3 N. Any excess of silver peroxide in this case can also easily be expelled and decomposed by the simple method of heating from 10 to 20 minutes on a water bath.

As a thorough test of all possible interferences of foreign ions in the use of this new reagent on manganese was performed and found non-existent, it can readily be supposed that the same can be said in the case of cerium too.

It is naturally to be expected that colored ions and other ions such as manganese or chromium which are oxidized by silver peroxide, will cause interference. But in actual instances of oxidation this disturbance is dexterously averted by easy separation of the rare earth group as oxalate, after precipitating it with Zr, Ti, Fe, Al, Cr and a portion of manganese by the ammonia treatment. And the equally undesirable large concentration of nitrate, chloride and fluoride ions can be removed

by an easy process of evaporation with sulfuric acid. The presence of any ferric ion which will interfere with the end point of titration by imparting a faint yellow coloration can also be eliminated by the addition of a little phosphoric acid.

b) General Procedure.

To the solution prepared for analysis under careful consideration of the above mentioned points, a sufficient amount of sulfuric acid is added to make a concentration of 3 N. To this an appropriate amount of silver peroxide is added while cold and heated from 10 to 20 minutes on a water bath followed by cooling under tap water. The addition of 0.01 N ferrous sulfate solution in slight excess thoroughly vanquishes the yellow coloration formed upon oxidation at this stage. The total amount of ferrous sulfate solution added must be noted here. Again it is cooled, and the addition of 1 ml of syrupy phosphoric acid is made. The resulting excess of ferrous sulfate is back titrated with 0.01 N potassium permanganate until it attains a pink end point persisting for approximately thirty seconds.

To ascertain the factor of ferrous sulfate and potassium permanganate solutions, it is advisable to have it checked now and then in the manner prescribed above.

$$1 \text{ ml of } 0.01 \text{ N } KMnO_4 = 0.00014013 \text{ g Ce.}$$

c) Result of Analysis.

The results obtained from several analyses with the described method are listed in the following. Besides showing that the method is practical, they indicate the accuracy attained in determining minute amounts of cerium.

Table 7. Accuracy.

Cerium present mg	Cerium found by *Knorr*'s modified method mg	Cerium found by the authors' method mg
2.83	3.21	2.84
	3.17	2.83
	3.21	2.84
1.42	—	1.42
		1.41
		1.42
1.90	—	1.86
	—	1.93
	—	1.93

Table 8. Reproducibility.

$FeSO_4$ ml	Titer (0,009803 N $KMnO_4$) ml	Equivalent to cerium ml	Found (as Ce) mg
2	0.69	1.38	1.90
	0.70	1.39	1.91
	0.69	1.38	1.90
	0.68	1.37	1.88
4	1.87	2.27	3.71
	1.89	2.25	3.68
	1.87	2.27	3.71
2	1.24	0.83	1.14
	1.19	0.88	1.21
	1.18	0.89	2.11

2 ml of ferrous sulfate solution is equivalent to 2.07 ml 0.009803 N $KMnO_4$.

Next run was tried in the sample solution separated from some of the rare earth minerals in the usual approved manner, and remarkably good results were also obtained.

Table 9. Determination of cerium in the presence of neighbouring rare earth elements.

Sample	Ce present mg	Ce added mg	Ce calculated mg	Ce found mg
Abukumalite	0.37	3.11	3.48	3.36
Tengerite	0.06	3.11	3.17	3.13
Xenotime.....	0.12	3.11	3.23	3.12

These tests have successfully proved the high adaptability of this new method in determining minute amounts of cerium in these minerals.

d) Discussion.

Without doubt the fine results can be attributed to the specific qualities of the new oxidizing reagent, and of the elements tested. The easy and complete removal of all traces of the reagent by the procedure proposed, completely eliminates fear of its action on ferrous sulfate, and thus makes possible a perfect quantitative and accurate determination of cerium. If this is otherwise, it would be responsible for bringing about a high value.

To illustrate its superiority by comparison with other methods proposed, it can first be said that it eliminates undesirable features the persulfate method which tends to give a value higher than real as already shown[21], owing to the difficulty of removing all traces of the reagent even upon addition of silver nitrate, which acts effectively as a catalyst. The sodium bismuthate method requires a highly pure bismuthate, sometimes difficult to obtain, and it also requires a complicated filtration by asbestos to remove the excess although the need of this latter operation has been much debated. *Someya*[22] has reported that it is unnecessary, while *Furman*[23] has stressed the high importance of this procedure even when pure sodium bismuthate is being used, as omission of filtration will mark slight differences in the results and thus sacrifice its accuracy. The potentiometric titration recommended by *Tomicek*[24] as an accurate method has not gained popular use for reasons that titration must be carried out in carbon dioxide atmosphere completely keeping air away, and a rough estimation of the cerium content must be made beforehand. Not only is this procedure troublesome, but a special apparatus is needed. In the method proposed by *Palmer* and *Browning*[25] with potassium ferrocyanide the filtering process after oxidation is

required, and *Weiss* and *Sieger*[19] has pointed it out as defective in obtaining accurate results in the determination of minute amount of cerium as 18 mg to 4 mg. This defect is responsible for the tendency to add an excess of potassium ferrocyanide in determining unknown amounts of the element. As filtration and separation are not necessary in our new method, these difficulties are not encountered. *Autié* recommended the method proposed by *Meyer* and *Schweitzer*[26], but it was not approved by *Weiss* and *Sieger* for the reason that the success in the determination is solely based upon the direct titration of cerous ion with potassium permanganate in an alkaline medium and it is not particularly reactive to cerium. Hence the use is limited and it is not precisely accurate in determining minute amount of cerium as this case presents.

Summary.

From these considerations the superiority of this new reagent can easily be concluded as follows: a) Simplicity and speediness of operation in oxidizing action; b) accuracy in result and reliability in reproducibility, as it is possible to determine such a minute quantities as 1 p. p. m. of manganese or 1 mg of cerium, not possible by any other method; c) non-interference of other metals, and especially in case of cerium the possibility of the determination in the presence of other neighbouring metals similar to the case of methods used hitherto; d) easy preparation and sufficient oxidizing power not reduced by long standing and availability for routine work.

The difficulties encountered in the use of sodium bismuthate and ammonium persulfate, widely used in routine work, are completely avoided in this new method and the new reagent.

Zusammenfassung.

Das Reaktionsprodukt aus Silbernitrat und Ammoniumpersulfat, dessen Zusammensetzung wenigstens teilweise dem Silberperoxyd entspricht, wird als Oxydationsmittel bei der kolorimetrischen Manganbestimmung erprobt. Es erweist sich hierfür als sehr gut geeignet und wird in seiner Wirkung durch die Anwesenheit anderer Ionen – soweit sie nicht selbst gefärbt sind – nicht gestört.

Ebenso bewährt es sich für die volumetrische Bestimmung von Cer wobei folgende Vorteile zur Geltung kommen:

a) Einfache und rasche Durchführung des Oxydationsprozesses;

b) verläßlich reproduzierbare Genauigkeit z. B. auch bei der Bestimmung von nur 0,0001% Mangan oder 1 mg Cer, wie sie mit anderen Verfahren nicht zu erzielen ist;

c) störungsfreie Anwendung auch bei Anwesenheit dem Cer benachbarter seltener Erden;

d) einfache Darstellung und ausreichendes, stabiles Oxydationsvermögen und daher Anwendbarkeit für Serienbestimmungen.

Die bei Verwendung von alkalischen Wismutlösungen und Ammoniumpersulfat auftretenden Nachteile werden gänzlich vermieden.

Résumé.

Le produit de la réaction entre le nitrate d'argent et le persulfate d'ammonium dont la composition correspond, au moins partiellement à celle d'un peroxyde d'argent, est essayé comme agent d'oxydation pour le dosage colorimétrique du manganèse. Il paraît très approprié pour cela et n'est pas altéré au cours de son action par la présence d'autres ions, sous la réserve qu'ils ne soient pas eux-mêmes colorés.

De même, il s'avère convenable pour le dosage volumétrique du cérium, les avantages suivants étant mis en valeur:

a) exécution simple et rapide du processus d'oxydation;

b) précision reproductible en toute confiance, même dans le dosage de 1 mg seulement de cérium que l'on ne peut chercher à atteindre par les autres méthodes;

c) utilisation dans interférence, même en présence des métaux de terres rares voisins;

d) préparation simple et capacité d'oxydation stable et suffisante; par suite, utilisation pour les dosages en série.

Les désavantages qui interviennent par emploi des solutions alcalines de bismuth et de persulfate d'ammonium sont complètement évités.

Bibliography.

[1] *H. H. Willard* et al., Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **15**, 486 (1942).

[2] *M. Dittrich*, Z. anorg. Chem. **80**, 171 (1913). – *R. Lang* and *F. Kurtz*, Z. analyt. Chem. **85**, 181 (1931).

[3] *G. A. Barbieri*, Ber. dtsch. chem. Ges. **60**, 2424 (1927). – *Travers*, C. r. acad. sci., Paris **182**, 972 (1926).

[4] *A. Pinkus* and *L. Ramakers*, Chem. Zbl. **1933 I**, 1658; Bull. soc. chim. Belg. **41**, 529 (1933).

[5] *Mellor*, Comprehensive Treatise on Inorganic and Theoretical Chemistry, vol. III, N. Y., 1929, p. 383. – *W. Machu*, Das Wasserstoff-Peroxyd und die Perverbindungen, Wien, **1937**, S. 236.

[6] *W. Crum*, Ann. Chem. **55**, 219 (1845). – *R. Wasmuth*, Z. angew. Chem. **42**, 133 (1929).

[7] *J. Reddrop* and *H. Ramage*, Trans. Chem. Soc. **67**, 288 (1895). — *R. O. Gortner* and *C. O. Rost*, Ind. Engng. Chem. **4**, 522 (1912).

[8] *H. Marshall*, Chem. News **83**, 76 (1901).

[9] *R. Lang*, Z. anorg. Chem. **158**, 370 (1926).

[10] *H. H. Willard* and *L. H. Greathouse*, J. Amer. Chem. Soc. **39**, 2366 (1917).

[11] *R. O. Gortner* and *C. O. Rost*, Ind. Engng. Chem. **4**, 522 (1912).

[12] *H. H. Willard* and *J. J. Thompson*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **3** 399 (1931). — *G. J. Hough*, ibid. **7**, 408 (1935).

[13] *M. Tanaka*, J. Chem. Soc. Japan, in Press.

[14] *M. Shima*, Sci. Pap. Inst. Physic. Chem. Res., in Press.

[15] *Y. Murakami* and *M. Tanaka*, Presented to the Discussion Meeting on the Inorganic-Analytical and Geo-chemistry Section of the Chemical Society of Japan, in Tokyo July 14 to 15th, 1948.

[16] *Knorr*, Z. angew. Chem. **10**, 685 (1897); *H. H. Willard* & *P. Youg*, J. Amer. Chem. Soc. **50**, 1397, 1928 (1928). — *W. W. Scott*, Standard Methods of Chemical Analysis, Vol. I, N. Y., 1939, p. 254.

[17] *J. Metzger*, J. Amer. Chem. Soc. **31**, 523, 1909 (1909). — *N. H. Furman*, J. Amer. Chem. Soc. **50**, 755 (1928). — *W. W. Scott*, Standard Methods of Chemical Analysis, Vol. I, N. Y., 1939, p. 255.

[18] *G. Autié*, Bull. soc. chim. France (4) **41**, 1535 (1927). — *E. Einecke*, Z. analyt. Chem. **93**, 145 (1933).

[19] *L. Weiss* and *H. Sieger*, Z. analyt. Chem. **113**, 305 (1938).

[20] *A. H. Kunz*, J. Amer. Chem. Soc. **53**, 98 (1931).

[21] See table 1; *L. Weiss* and *H. Sieger*, Z. analyt. Chem. **113**, 305 (1938).

[22] *K. Someya*, Z. anorg. Chem. **168**, 56 (1927).

[23] *N. H. Furman*, J. Amer. Chem. Soc. **50**, 755 (1928). — *W. W. Scott*, Standard Methods of Chemical Analysis, Vol. I, N. Y., 1939, p. 256.

[24] *O. Tomicek*, Rec. trav. chim. Pays-Bas **44**, 410 (1925); Z. analyt. Chem. **93**, 146 (1933).

[25] *P. E. Browning* and *H. F. Palmer*, Z. anorg. Chem. **59**, 71 (1908); Z. analyt. Chem. **58**, 360 (1919).

[26] *R. J. Meyer* and *A. Schweitzer*, Z. anorg. Chem. **54**, 104 (1907); Z. analyt. Chem. **48**, 684 (1909).

Laboratoire Municipal de Paris. Section de Microanalyse.

Microdosage rapide des halogènes dans les composés organiques.

Microdétermination potentiométrique des ions chlore, brome et iode par la méthode des potentiels d'équivalence repérés après minéralisation dans la microbombe de *Parr*.

Par

R. Lévy.

Avec 4 figures.

(Reçu le 18 juillet 1950.)

I. Introduction.

Grâce aux avantages apportés par ses techniques, la microanalyse organique évince progressivement, mais sûrement, la déjà vieille macroanalyse. Petits laboratoires universitaires, laboratoires d'usines, grands laboratoires spécialisés naissent et se développent dans tous les pays. Parallèlement, les demandes d'analyses affluent vers ces laboratoires ce qui contraint les microanalystes à rechercher des méthodes de dosage qui, tout en conservant leur précision, deviennent de plus en plus rapides et susceptibles d'être appliquées par de simples manipulateurs; en d'autres termes, le rendement de la main-d'oeuvre employée à l'exécution des analyses doit devenir aussi élevé que possible.

Dans ce sens, des travaux remarquables concernant les microdosages du carbone et de l'hydrogène, de l'azote, de l'oxygène, du soufre, ont été effectués par *Zimmermann* entre autres[1, 2, 3, 4]; l'automatisme ou le semi-automatisme des méthodes mises au point permet d'éliminer, en particulier, les erreurs pouvant être introduites par les opérateurs.

En ce qui concerne les halogènes chlore, brome et iode, on connait de nombreuses méthodes qui conduisent à d'excellents résultats mais dont l'exécution comporte des manipulations souvent délicates et, en tout cas, de durée relativement longue.

Dans le microdosage de ces éléments, il est possible de distinguer deux phases:

1° la minéralisation

2° le dosage proprement dit.

Parmi les méthodes de minéralisation, il n'en est aucune qui puisse lutter, du point de vue de la simplicité et de la rapidité des opérations, avec la méthode

d'attaque de la substance par le peroxyde de sodium dans la bombe de *Parr*, méthode mise au point à l'échelle microanalytique par *Elek* et *Hill* en 1933[5].

Il est évident que cette méthode ne conserve entièrement son intérêt que si le dosage consécutif des halogènes peut s'effectuer avec une simplicité et une rapidité comparables.

Elek et *Hill*, dans leur travail original, dosaient le chlore, le brome et l'iode (après réduction du bromate ou de l'iodate formés par le sulfate d'hydrazine) en les précipitant, les filtrant et les pesant sous forme d'halogénure d'argent en suivant la technique opératoire de *Pregl*. Dans un tel dosage considéré, «isolément» il faut vingt cinq minutes pour obtenir une solution de l'ion halogène: le reste des opérations depuis la précipitation de l'halogènure d'argent jusqu'à sa pesée finale dure d'après *Niederl* et *Niederl*[6] environ 85 minutes, ce qui est évidemment prohibitif par rapport aux 25 minutes nécessaires à la minéralisation et à la solubilisation. En outre, le facteur de conversion de la masse d'halogènure d'argent pesé en masse d'halogène à déterminer devient de plus en plus défavorable lorsqu'on passe du chlore au brome et du brome à l'iode; il est en effet égal à:

0,2474 pour le chlore
0,4255 „ „ brome
0,5406 „ l'iode.

Elek et *Harte*[7] ont levé les objections de longue durée et de facteur de calcul défavorable en ce qui concerne le dosage de l'iode; celui-ci transformé en ion iodique est dosé par iodométrie classique, ce qui permet finalement de déterminer, à l'aide de thiosulfate 0,01 N, 6 atomes d'iode pour un seul à doser. Cette méthode est rapide et excellente; on peut cependant critiquer l'emploi de solutions 0,01 N de thiosulfate de sodium qui s'altèrent rapidement et contraignent à des réétalonnages fréquents comme l'indique *W. W. Scott*[8]; en outre, le virage final en présence d'empois d'amidon ne peut être apprécié avec précision que par un opérateur très exercé. On verra qu'il est possible de substituer à cette méthode de dosage de l'iode une méthode aussi précise, ne nécessitant de l'opérateur aucune qualité particulière et de plus identique à celle qui sera utilisée pour le dosage du chlore et du brome.

Il résulte de la brève étude qui précède qu'il convient d'éliminer le dosage gravimétrique des halogènes par pesée de l'halogènure d'argent correspondant si l'on veut pleinement bénéficier des avantages apportés par la minéralisation dans la microbombe de *Parr*.

Il faut donc s'adresser aux méthodes volumétriques.

L'examen de la littérature chimique montre que pour de semblables dosages effectués aux échelles semi-microanalytiques ou microanalytiques on a uniquement fait appel aux méthodes volumétriques argentométriques.

Ces méthodes se différencient par la technique particulière employée pour déterminer le point final de la titration; on peut ainsi distinguer:

1° le dosage de l'ion halogène par «micro Volhard»

2° le dosage de l'ion halogène par le nitrate d'argent en présence d'indicateurs d'adsorption

3° le dosage de l'ion halogène par argentométrie potentiométrique.

Peel, Clark et *Wagner*[9] ont montré que la méthode de Volhard ne convient pas pour effectuer le «*semi-microdosage*» des halogènes après minéralisation par le peroxyde de sodium; dans les conditions ainsi réalisées de volume et de concentration de sels, il est impossible d'utiliser des solutions titrées de concentration inférieure à 0,02 N pour que le point final de la titration

soit déterminé de façon satisfaisante; avec de tels titres, pour des prises d'essais normales, le volume effectif de solution titrée consommée par la titration est faible pour le brome et l'iode, ce qui conduit à des erreurs relativement importantes; les conclusions de *Peel*, *Clark* et *Wagner* peuvent être transposées à l'échelle microanalytique, en particulier en ce qui concerne la concentration trop élevée des solutions titrées susceptibles d'être utilisées pour le dosage du brome et de l'iode; on verra ultérieurement que dans le travail objet de la présente communication, on utilise pour le dosage de ces deux halogènes, une solution titrée de nitrate d'argent 0,002 N.

Le dosage des halogènes par le nitrate d'argent en présence d'indicateurs d'adsorption semble séduisant. C'est ainsi que, par exemple, l'emploi de la dichlorofluorescéine permet de doser l'ion chlore dans des solutions 0,0005 N dans certaines conditions de p_H 10; il est malheureusement vraisemblable, comme l'ont d'ailleurs fait remarquer *Peel*, *Clark* et *Wagner*[9], que la concentration très élevée en sels alcalins des solutions d'ions halogènes à doser interdise cette technique.

Le dosage des halogènes par argentométrie potentiométrique dans les conditions très spéciales qui résultent de la minéralisation dans la microbombe de *Parr* ne semble guère avoir tenté les microanalystes organiciens.

Dans les méthodes classiques d'argentométrie potentiométrique, on observe le potentiel d'une électrode indicatrice d'argent plongeant dans la solution à titrer lorsqu'on y introduit progressivement du nitrate d'argent. Le point équivalent ou point final de la titration est atteint lorsque ce potentiel, qui varie d'abord régulièrement, subit un brusque accroissement lors de l'addition d'une goutte de réactif titrant.

Le microdosage des halogènes par l'une de ces méthodes, dans la solution provenant de la minéralisation des composés organiques dans la microbombe de *Parr*, se heurte à des difficultés qui se traduisent pratiquement par l'atténuation et même la disparition du « saut de potentiel » au point équivalent. Ce phénomène gênant est dû aux 3 facteurs principaux suivants:

la faible concentration des solutions titrées de nitrate d'argent employées à l'échelle microanalytique,

la faible concentration des solutions d'ions à titrer,

la haute concentration en sels de sodium de ces solutions.

Les deux premiers facteurs seuls ne seraient pas suffisants pour rendre impossible le dosage potentiométrique des halogènes à l'échelle microanalytique par la méthode classique. C'est ainsi que *E. Zintl* et *K. Betz*[11] ont montré qu'il est possible de doser des solutions pures et très diluées de chlorures avec des solutions de nitrate d'argent 0,001 N dilution qu'il n'est pas nécessaire d'atteindre, comme on le verra, dans le problème du microdosage des halogènes dans les composés organiques.

C'est surtout la haute concentration saline de ces solutions qui, jointe aux deux conditions précédentes, rend impraticable la méthode classique de dosage potentiométrique tout au moins dans le cas du chlore*; en effet, dans ce cas, la courbe des potentiels ne présente plus d'inflexion sensible au voisinage du point équivalent; elle devient pratiquement linéaire; autrement dit, les additions successives de plusieurs gouttes du réactif titrant provoquent au voisinage du point équivalent des variations de potentiels corrélatives qui sont sensiblement égales entre elles.

* C'est pour le chlore que les sauts de potentiels sont les plus faibles au voisinage du point équivalent.

Malgré ces difficultés, *Zimmermann*[12] a pu effectuer le «*semi-microdosage*» des halogènes par la méthode potentiométrique classique après minéralisation dans la microbombe de *Parr*. Il utilise un pHmètre comme potentiomètre; son réactif titrant est une solution de nitrate d'argent 0,02 N mesurée dans une «*macroburette*» pouvant délivrer des gouttes d'un volume de 0,05 ml. La masse de la prise d'essai de substances organiques à analyser est de l'ordre de grandeur de 30 mg. Il dose ainsi le chlore et le brome.

Le stade «semi-microanalytique» ne peut cependant être entièrement satisfaisant pour un laboratoire de microanalyse où trop souvent les échantillons soumis à l'analyse sont juste suffisants pour travailler à l'échelle microanalytique.

En outre, la durée d'une opération complète de titrage du chlore par la méthode potentiométrique classique peut varier de dix à quinze minutes, suivant le type de potentiomètre utilisé, temps qui peut être notablement réduit par la méthode objet du présent travail.

Au cours de ce travail on a enfin constaté que d'une façon générale, pour des substances très volatiles ou aisément sublimables, la méthode de minéralisation dans la microbombe de *Parr* est d'application plus sûre à l'échelle microanalytique qu'à l'échelle semi-microanalytique.

Le passage à l'échelle microanalytique implique, d'après les considérations qui précèdent, l'abandon de la méthode potentiométrique «*classique*» de dosage des ions halogènes ou tout au moins de l'ion chlore.

Au contraire les méthodes de *Treadwell* et de *Pinkhof*[13, 14] d'une part, et la méthode apparentée de *E. Müller*[15] d'autre part, semblent susceptibles d'être utilisées avec succès à cette échelle. Dans les deux premières méthodes, on oppose à l'électrode indicatrice (fil d'argent, dans le cas du dosage des ions halogènes par le nitrate d'argent) une électrode de référence dont le potentiel est égal à celui que prendra l'électrode indicatrice lorsque la quantité du réactif titrant (nitrate d'argent) ajoutée à la solution de l'ion halogène à doser lui sera équivalente (point équivalent). Il suffit donc, en principe, d'intercaler un appareil de mesure (galvanomètre, électromètre) dans un circuit se fermant sur les deux électrodes et d'ajouter à la solution à titrer du nitrate d'argent jusqu'à ce que l'indicateur de l'appareil de mesure indique zéro. La méthode développée par *E. Müller* est basée sur le même principe mais il oppose à la force électromotrice de la cellule de titration (argent/solution à titrer/électrode de référence au calomel) la différence de potentiel aux bornes d'un potentiomètre réglée à la valeur préalablement déterminée que prendra cette force électromotrice au point équivalent.

Les méthodes de *Treadwell-Pinkhof* et de *Müller* sont extrêmement rapides; celle de *Müller* présente en outre sur les deux premières, l'avantage de ne pas nécessiter une électrode de référence différente pour chaque type de dosage à effectuer (il faudrait pour les halogènes trois électrodes: une pour le chlore, une pour le brome et une pour l'iode); toutefois, elle suppose la connaissance préalable de la valeur de la force électromotrice de la cellule de titration au point équivalent. *Bellamy*[16] repère expérimentalement cette force électromotrice d'équivalence et dose potentiométriquement l'argent avec une solution titrée de chlorure de sodium par application d'une méthode à peu près identique à celle de *Müller*. Dans ce but, il utilise un appareil spécialement conçu à cet effet, le titrimètre *Jouan*.

L'étude de la transposition de la méthode employée par *Bellamy* au microdosage dans les composés organiques du chlore, du brome ou de l'iode par argentométrie potentiométrique, après minéralisation dans la microbombe de *Parr*, constitue l'objet de la présente communication.

II. Méthode des potentiels d'équivalence repérés.

Avant d'étudier le dosage potentiométrique proprement dit des halogènes, il est nécessaire de passer en revue les différentes phases de l'analyse complète du composé halogéné initial car elles en déterminent les conditions.

1° Minéralisation et solubilisation des halogènes.

Le principe de la méthode de minéralisation peut être, aujourd'hui, considéré comme classique: l'échantillon de substance soumis à l'analyse est pesé, puis «brûlé» dans la microbombe par du peroxyde de sodium en fort excès, en présence d'un mélange initiateur de nitrate de potassium et de saccharose, après amorçage de la réaction par chauffage de la bombe sur la flamme d'un microbrûleur[5].

Il convient de souligner d'ores et déjà la nécessité d'un contrôle soigné de la constance des masses de réactifs employés pour permettre l'application correcte du dosage potentiométrique ultérieur des halogènes.

La masse fondue obtenue dans la bombe est dissoute dans l'eau, l'eau oxygénée formée est détruite et la solution obtenue est neutralisée par de l'acide sulfurique en présence d'un indicateur coloré à virage acide (hélianthine).

Le choix de l'acide sulfurique au lieu de l'acide nitrique habituellement employé, a eu pour but initial d'éviter l'emploi d'un acide nitrique de qualité spéciale, rigoureusement exempt d'oxydes de l'azote susceptibles, dans le cas du dosage de l'iode, de réagir sur les iodures formés; par la suite, on a généralisé l'emploi de cet acide aux dosages des trois halogènes.

Dans le cas de l'iode qui est quasi quantitativement transformé en iodate par la minéralisation, on le réduit en iodure par chauffage de la solution au bain-marie en présence de sulfate d'hydrazine[5].

Ainsi pour l'un quelconque des trois halogènes, chlore, brome ou iode, on obtient une solution d'halogénure à réaction légèrement sulfurique, très concentrée en sulfate de sodium.

2° Cellule de titration.

C'est directement sur la solution précédemment obtenue qu'est effectué le titrage potentiométrique des halogènes.

La cellule de titration est constituée par un bécher contenant la solution à titrer dans laquelle plongent l'électrode indicatrice, l'électrode de référence et un système d'agitation. Elle est représentée sur la figure 1.

Le bécher *B* est en verre Pyrex d'une capacité de 100 ml et de forme dite haute (diamètre du bécher 5 cm). L'électrode indicatrice *I* est un cylindre d'argent pur de 5 à 6 mm de diamètre environ; elle est montée dans un support isolant *S* qui peut tourner à frottement dur autour d'un

axe horizontal x—y. Entre deux dosages, cette électrode est simplement nettoyée par rinçage avec un jet de pissette d'eau distillée; il arrive cependant qu'elle se recouvre d'un dépôt d'halogénure d'argent au cours d'une série de dosages et il suffit de la faire pivoter autour de l'axe x—y pour la nettoyer très rapidement, sans la démonter, par simple essuyage avec un morceau de papier filtre; si elle vient à s'oxyder, on peut la nettoyer avec du papier émeri à grain fin.

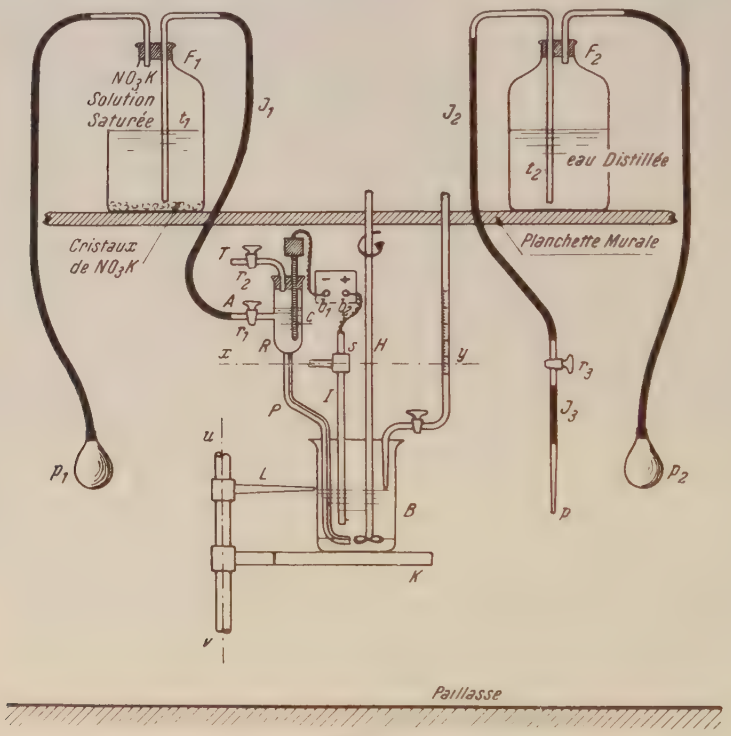


Fig. 1.

L'électrode de référence C est une électrode au calomel de haute résistance en forme de crayon (figure 2) décrite par *Charlot* et *Bezier*[18].

Il n'est pas recommandable de la plonger directement dans la solution à titrer, elle y est reliée par un pont liquide d'une solution saturée de nitrate de potassium. Ce pont, conçu de façon spéciale, est une modification de celui qui est utilisé par *Bellamy*[16]. Il est constitué (figure 1) par un réservoir cylindrique de verre R d'environ 2 cm de diamètre et 5 cm de hauteur terminé à sa partie inférieure par un tube capillaire P de 2 mm de lumière. Ce réservoir porte en outre latéralement, un ajutage A muni d'un robinet r_1. Le tube capillaire P, coudé comme l'indique la

figure, plonge dans la solution à titrer, sa partie inférieure, horizontale, est courbée parallèlement à la paroi du bécher dans le sens de rotation de l'agitateur.

Le réservoir R est fermé par un bouchon de caoutchouc à deux trous dont l'un est traversé par l'électrode au calomel C et l'autre par un tube coudé T débouchant à l'air et muni d'un robinet r_2. L'ajutage A est relié par un tuyau de feuille anglaise J_1 à un tube t_1 pouvant siphonner un flacon de deux litres F_1 en charge par rapport au réservoir R et rempli d'une solution saturée de nitrate de potassium. Pour remplir le réservoir R et le pont P de la solution saturée de nitrate de potassium on bouche avec un doigt l'extrémité inférieure du pont P, ouvre les robinets r_1 et r_2 et amorce le siphon du réservoir F_1 à l'aide de la poire p_1; lorsque le réservoir R est rempli, on ferme le robinet r_2 et débouche l'extremité inférieure du pont P jusqu'à ce que la solution saturée de nitrate de potassium s'y écoule; on ferme le robinet r_1; le pont de jonction est alors constitué. Entre deux dosages successifs il suffit d'ouvrir pendant une à deux secondes le robinet r_1 pour rincer le pont P. Lorsque l'appareil est inutilisé, entre deux séries de dosages, ou pendant la nuit, on vide le réservoir R et le pont P pour éviter l'appauvrissement de l'électrode au calomel en chlorure de potassium par diffusion.

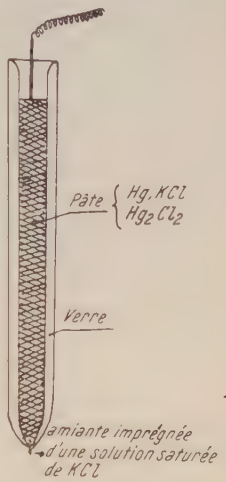


Fig. 2.

Ce dispositif de pont de jonction permet d'éviter la diffusion du liquide à titrer dans le pont et rend négligeable l'effet de la diffusion des sels de l'électrode de référence dans la solution de nitrate de potassium du pont, pendant une série de dosages, du fait du renouvellement de cette solution.

Le système d'agitation peut être constitué par une tige de verre H terminée à sa partie inférieure par une hélice à quatre pales (figure 1) ou par un agitateur électromagnétique placé dans un champ magnétique tournant. Le bécher de titration est placé sur une tablette de céramique K qui peut s'escamoter par rotation autour d'un axe vertical u—v. Les manoeuvres du bécher de titration peuvent ainsi s'effectuer très rapidement.

Après chaque dosage, l'électrode d'argent, le capillaire du pont P, l'agitateur sont rincés avec un jet de pissette d'eau distillée et peuvent être réutilisés immédiatement pour le dosage suivant.

La cellule de titration qui vient d'être décrite permet des manipulations extrêmement rapides et élimine tout facteur de perturbation sensible des dosages potentiométriques.

3° Titrimètre et titration.

Lors du titrage potentiométrique des halogènes il est nécessaire de repérer le potentiel de l'électrode indicatrice ou. ce qui revient au même, la différence de potentiel entre les électrodes de la cellule de titration. A cet effet, on lui oppose, par l'intermédiaire des bornes b_1 et b_2 (figures 1 et 3) la différence de potentiel aux bornes d'un potentiomètre réglable (figure 3). La somme algébrique de ces deux différences de potentiel est

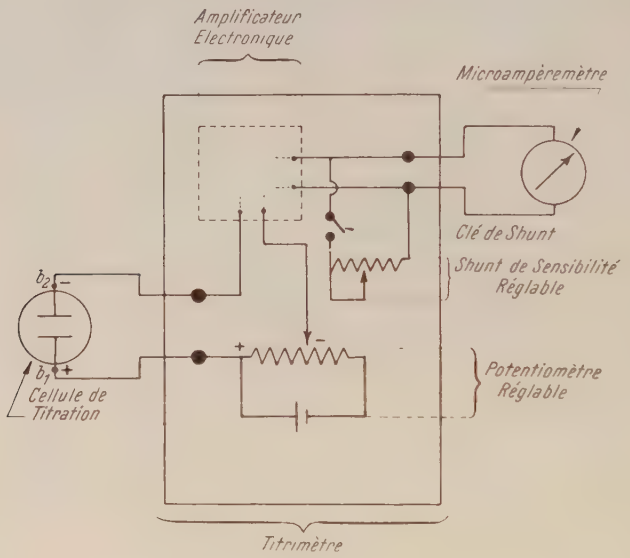


Fig. 3. Position „Mesures".

amplifiée par un dispositif électronique; la différence de potentiel ainsi amplifiée est elle-même appliquée aux bornes d'un appareil de mesure (microampèremètre de la figure 3).

L'amplificateur électronique (représenté sur la figure 3 par un rectangle pointillé) a pour but de permettre de faire passer un courant électrique dans l'appareil de mesure sans qu'il passe un courant appréciable dans la cellule de titration afin d'éviter tout phénomène de polarisation; cet amplificateur est conçu de telle façon que l'appareil de mesure indique un courant nul lorsque les différences de potentiel aux bornes de la cellule de titration d'une part, et aux bornes du potentiomètre d'autre part, sont égales et de signes contraires.

L'appareil de mesure possède en outre un shunt de sensibilité réglable susceptible d'être mis hors circuit à l'aide d'une clé de shunt (figure 3). Ce shunt, comme le potentiomètre, fait partie du titrimètre utilisé. Cet appareil est le titrimètre *Jouan*. Un dispositif de commutation porté

par ce titrimètre permet, en outre, en mettant en série sur l'appareil de mesure une résistance R, de repérer la différence de potentiel existant aux bornes du potentiomètre pour un réglage quelconque de celui-ci (figure 4).

Le dosage d'un ion halogène dans la solution de la cellule de titration comporte alors les deux phases suivantes:

1° *Repérage du potentiel d'équivalence.*

Ce potentiel doit être repéré dans des conditions (de salinité, d'acidité, etc...) rigoureusement identiques à celles dans lesquelles seront effectuées les titrations proprement dites.

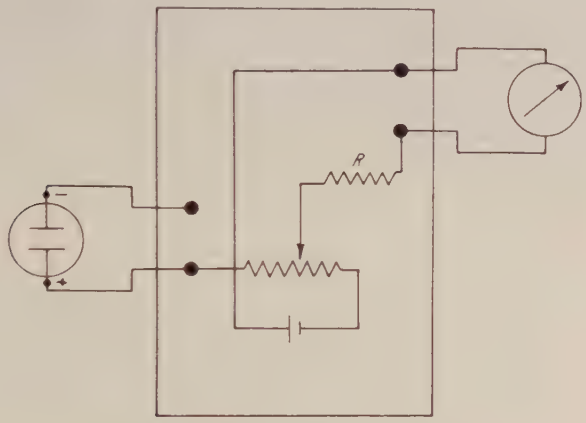


Fig. 4. Position „Repérage du potentiel".

A cet effet, on effectue une opération de minéralisation dans la microbombe de *Parr* mais en remplaçant l'échantillon de substance organique à analyser par une prise d'essai *pesée* de chlorure de potassium ou de bromure de potassium ou d'iodate de potassium analytiquement purs selon que l'on voudra repérer la force électromotrice de la cellule de titration au point équivalent correspondant au dosage du chlore ou du brome ou de l'iode. En effectuant la suite des opérations précédemment décrites au paragraphe «Minéralisation et solubilisation des halogènes» on obtient finalement dans la cellule de titration une solution légèrement sulfurique d'ions chlore ou brome ou iode, en quantité connue correspondant aux masses pesées de chlorure ou de bromure ou d'iodate de potassium. On calcule alors le volume v de nitrate d'argent titré qui est «équivalent» à la quantité de l'ion halogène considéré.

Afin de repérer exactement la force électromotrice de la cellule de titration et par conséquent le potentiel de l'électrode indicatrice au point équivalent, il est nécessaire d'assurer la constance de tous les facteurs

susceptibles d'en faire varier la valeur absolue; on a déjà vu que les masses des réactifs employés devaient être rigoureusement contrôlées; la quantité d'acide sulfurique ajoutée ultérieurement étant également déterminée, par voie de conséquence, la concentration saline de la solution qui est l'un des facteurs les plus importants pouvant faire varier le potentiel de l'électrode indicatrice au point équivalent ne sera plus fonction que du *volume final* de la solution lorsque ce point sera atteint. *Il est donc nécessaire que ce volume final soit déterminé et maintenu constant.* Ce volume est choisi pratiquement, une fois pour toutes, en tenant compte du volume minimum des eaux nécessaires au lavage quantitatif de la microbombe de *Parr* et du volume de la solution titrante (nitrate d'argent) à introduire dans la cellule de titration. Il doit être suffisamment grand pour ne pas risquer d'être dépassé lorsque les manipulations seront effectuées par un opérateur plus ou moins habile. Sa valeur absolue n'a pas l'importance qu'il présente lors des titrations potentiométriques classiques pour lesquelles le saut de potentiel est d'autant plus élevé que ce volume est plus faible. Le fait de repérer la valeur absolue du potentiel rend secondaire l'ordre de grandeur de ce volume car on opère dans des conditions où, comme on l'a vu, la courbe des potentiels est quasi linéaire tout au moins lorsqu'il s'agit de l'ion chlore.

Le repérage du point équivalent s'effectue, compte tenu des considérations précédentes. en introduisant dans la solution d'ion halogène de la cellule de titration, connectée au titrimètre comme l'indique la figure 3, un volume de solution de nitrate d'argent $v—\Delta v$ légèrement inférieur (de quelques dizièmes de millilitres) au volume équivalent v précédemment calculé. On ajuste alors le volume de la solution de la cellule au volume final choisi par addition d'eau bidistillée et ajoute le volume restant Δv de nitrate d'argent le volume total de nitrate d'argent titré introduit dans la solution est alors égal au volume équivalent v.

Cette façon d'opérer permet, si Δv n'est pas trop petit, d'atteindre le potentiel d'équilibre au point équivalent aussi rapidement que si l'on n'avait pas effectué de dilution grâce à la précipitation complémentaire d'halogénure d'argent correspondant au volume Δv de nitrate d'argent.

Pratiquement, on se contente d'ajuster la hauteur finale de liquide dans le bécher de titration à une valeur prédéterminée correspondant au volume final choisi*; une pointe métallique L de hauteur réglable par rapport à la tablette K de support du bécher et pouvant s'escamoter en même temps que cette tablette par rotation autour de l'axe vertical $u—v$ permet le repérage du niveau de la solution dans le bécher et son ajustement à la hauteur choisie (figure 1).

* Tous le béchers de titration, en verre Pyrex moulé, étant pratiquement identiques.

L'opération de dilution par l'eau distillée est effectuée dans un temps minimum si l'on dispose d'une réserve d'eau distillée contenue dans un flacon F_2 en charge par rapport au bécher de titration; un tube de siphonnage t_2 relié à un tuyau de feuille anglaise J_2, à un robinet de verre r_3 et à un tube de verre étiré en pointe p permettent d'introduire rapidement dans le bécher la quantité d'eau nécessaire à l'ajustement du niveau de la solution à la hauteur de la pointe L.

La dilution n'est peut-être pas nécessaire dans le cas de l'iode où les variations de potentiel de l'électrode indicatrice dues à l'introduction d'une goutte de nitrate d'argent 0.002 N sont supérieures à celles qui pourraient provenir de la variation de la concentration saline de la solution au point équivalent: *quoi qu'il en soit, dans tous les cas, cette opération a «pratiquement» un effet des plus favorables sur la reproductibilité et la précision des résultats obtenus*; on l'a donc introduite d'une façon générale, quel que soit l'halogène considéré.

Après introduction du volume $1\ v$ de nitrate d'argent on met le commutateur du titrimètre sur la position «Mesures» (figure 3) et règle le rhéostat du potentiomètre de façon à amener à zéro l'aiguille du microampèremètre non shunté (la clé de shunt étant ouverte afin d'obtenir le maximum de sensibilité).

En plaçant alors le commutateur sur la position «Repérage du potentiel aux bornes du potentiomètre» (figure 4) on repère la force électromotrice de la cellule de titration, et par conséquent la potentiel de l'électrode indicatrice, par simple lecture de la déviation de l'aiguille du microampèremètre exprimée en unités quelconques correspondant à la graduation de l'échelle de cet appareil.

On peut repérer ainsi trois potentiels correspondant respectivement au chlore, au brome et à l'iode.

Les repérages des potentiels d'équivalence peuvent être évidemment effectués une fois pour toutes.

On a toutefois intérêt à les recommencer périodiquement, ce qui permet de déceler tout facteur éventuel de perturbation.

2° *Titrage des ions halogènes.*

La cellule de titration contenant la solution des ions halogènes à doser est connectée au titrimètre comme l'indique la figure 3. On met alors le commutateur du titrimètre sur la position «Repérage du potentiel» (figure 4) et règle la différence de potentiel aux bornes du potentiomètre à la valeur repérée antérieurement, pour l'halogène considéré. On revient alors à la position «Mesures» (figure 3) le microampèremètre étant tout d'abord à sa sensibilité minimum.

L'opération de titrage consiste à ajouter du nitrate d'argent de titre connu à la cellule de titration jusqu'à ce que soit atteint le point équi-

valent dans des conditions identiques à celles du repérage du potentiel d'équivalence. Il suffit à cet effet de ramener à zéro l'aiguille du microampèremètre que l'on shunte évidemment de façon dégressive pour que l'aiguille reste constamment dans les limites de l'échelle de lecture visible. Lorsque la sensibilité maximum est atteinte (clé de shunt ouverte), l'aiguille étant encore à sa déviation maximum, on dilue la solution au volume final déjà choisi lors du repérage du potentiel d'équivalence qui ainsi sera toujours identique à lui-même. Il reste alors à ajouter quelques gouttes de nitrate d'argent pour ramener à zéro l'aiguille du microampèremètre. On lit sur la burette le volume de nitrate d'argent de titre connu qui a été ajouté à la solution de la cellule de titration et qui est équivalent à la quantité d'ions halogènes à doser dont le calcul est ainsi immédiat.

On conçoit déjà combien cette méthode de titration est rapide puisque pratiquement la position de l'aiguille du microampéremétre renseigne à chaque instant l'opérateur sur l'état d'avancement de la titration, ce que ne permettent ni les méthodes potentiométriques à saut de potentiel, ni les méthodes à indicateur de point équivalent (indicateurs colorés, indicateurs d'adsorption, indicateurs électrométriques): elle a en outre l'avantage de ne pas laisser le point final de la titration à l'appréciation subjective de cet opérateur.

III. Mode opératoire.

Le mode opératoire du dosage des halogènes (chlore, brome et iode) dans les substances organiques a déjà fait l'objet d'une description préliminaire dans le paragraphe II, sous la rubrique générale «Méthode des potentiels repérés» tout au moins en ce qui concerne les manipulations.

En conséquence, l'objet principal de ce nouveau paragraphe sera de préciser les données numériques relatives aux quantités ou titres des réactifs employés à côté de quelques détails complémentaires concernant les manipulations.

On peut distinguer deux phases dans le mode opératoire:

1° la minéralisation et la solubilisation de l'échantillon soumis à l'analyse,

2° le titrage potentiométrique des halogènes.

1° *Minéralisation et solubilisation.*

Le mode opératoire adopté pour la minéralisation de la substance organique dans la microbombe de *Parr* est décrit dans une publication de *B. Wurzschmitt* et *W. Zimmermann*[17] et a été l'objet de communications directes antérieures faites par *W. Zimmermann* à l'auteur.

Le matériel utilisé, c'est-à-dire la bombe de nickel pur, son couvercle, son étrier de fermeture serrage et ouverture, les pinces supports, etc... est également décrit dans la même publication*.

On n'insistera ici que sur les points particulièrement importants pour la suite du dosage.

* La microbombe de *B. Wurzschmitt* et *Zimmermann* a la même capacité que celle de *Elek* et *Hill*[5]; l'auteur a adopté la variante qui consiste à employer une rondelle d'aluminium pur de 0,2 mm d'épaisseur comme joint d'étanchéité.

Réactifs. Les réactifs de minéralisation sont les suivants:
peroxyde de sodium «*pulvérulent*» pur p. a.,
nitrate de potassium pur p. a.,
saccharose pur p. a. ou sucre de canne pulvérisé.

Ces réactifs doivent être, en particulier, exempts d'halogènes; au cas où cette condition ne serait pas remplie, il conviendrait d'effectuer sur les résultats trouvés pour le dosage des halogènes dans les substances organiques, une correction d'essai à blanc. Cet essai effectué sur l'ensemble des réactifs, dans des conditions opératoires rigoureusement identiques (minéralisation en bombe et potentiométrie) à celles d'un dosage effectif des halogènes dans les échantillons soumis à l'analyse.

Les quantités de réactif qui ont été effectivement utilisées pour chaque essai, au cours du présent travail, sont les suivantes:

Peroxyde de sodium	3 g
Nitrate de potassium	0,250 g
Saccharose	0,100 g.

Le peroxyde de sodium est introduit dans la microbombe en deux fractions égales de 1.5 g: la première est préalablement mélangée à la totalité du nitrate de potassium et du saccharose dans un récipient mélangeur. Si le produit à analyser est solide, cette première fraction est mélangée dans la bombe à l'aide d'une pointe de verre pyrex (qui y reste) à la prise d'essai à analyser préalablement pesée. Si le produit à analyser est visqueux ou liquide, la prise d'essai est tout d'abord introduite dans la bombe dans un microbécher ou une microampoule en verre soluble au phosphate (*B. Wurzschmitt* et *W. Zimmermann*[17]) qui est ensuite recouvert par la première fraction de peroxyde de sodium.

On introduit alors la seconde fraction dans la microbombe que l'on ferme.

On a insisté à diverses reprises sur l'importance du contrôle des quantités de réactif employées. Pratiquement on a constaté qu'il suffit de mesurer ces réactifs à l'aide de petites cuillers en verre ou matière plastique de capacité correspondant à la masse de réactif à introduire et préalablement déterminée. Il convient de remarquer qu'il n'est possible de s'abstenir de peser les réactifs que si les cuillers, en particulier la cuiller à peroxyde de sodium, sont maintenues dans un état de propreté absolue. L'expérience a montré, en outre, la nécessité de vérifier la correspondance entre la capacité des cuillers et la masse des réactifs qu'elles peuvent contenir chaque fois qu'un lot de réactif est épuisé. La densité apparente du nouveau lot diffère souvent, en effet, de celle du lot précédent (c'est, en particulier, le cas de saccharoses d'origines différentes).

Prises d'essais. La masse des prises d'essais est déterminée avec une microbalance: elle doit évidemment varier suivant la teneur en

halogènes des substances à analyser, et doit correspondre à un volume de solution titrée de nitrate d'argent inférieur à 10 ml (capacité des burettes utilisées); dans le cas du chlore où l'on emploie du nitrate d'argent 0,01 N, 5 mg d'une prise d'essai contenant environ 35% de chlore correspondent à 5 ml de solution titrée; en principe, les prises d'essais varieront suivant la teneur en chlore de 3 à 10 mg. Pour la détermination du potentiel d'équivalence du chlore, on remplace ces prises d'essais par une masse exactement connue voisine de 7 mg de chlorure de potassium, ce qui correspond à 9—10 ml de nitrate d'argent 0,01 N.

Dand le cas du brome et de l'iode, où l'on emploie du nitrate d'argent 0,002 N il suffit de prendre des prises d'essais dont les masses sont de 2 à 3 mg. Pour la détermination des potentiels d'équivalence du brome et de l'iode on remplace ces prises d'essais par des masses exactement connues et respectivement voisines de 2 mg de bromure de potassium pour le brome et de 4 mg d'iodate de potassium pour l'iode, ce qui correspond à environ 9 ml de nitrate d'argent 0,002 N.

Solubilisation et neutralisation.

L'attaque étant terminée, le contenu de la microbombe est directement traité à l'eau bidistillée exempte d'halogène, à chaud, comme l'indiquent *B. Wurzschmitt* et *W. Zimmermann*, dans le bécher de verre Pyrex servant ultérieurement à la titration (capacité 100 ml, diamètre 5 cm).

La bombe et son couvercle sont lavés à l'eau bidistillée bouillante exempte d'halogènes de façon que le volume total des eaux de solubilisation et de lavage soit de 50 à 60 ml.

L'acide sulfurique utilisé pour la neutralisation de ces eaux est préparé par mélange de 2 volumes d'acide sulfurique à 66° Beaumé à 3 volumes d'eau bidistillée exempte d'halogène.

Il est contenu dans une burette automatique, ce qui permet, le volume nécessaire à la neutralisation étant toujours du même ordre de grandeur, d'effectuer celle-ci dans un temps minimum; cet acide est introduit dans la solution à neutraliser contenant une goutte d'hélianthine en solution aqueuse à 1‰ jusqu'à ce qu'une goutte d'acide provoque le virage au rose de cet indicateur; la solution est alors acide; l'expérience a montré qu'un excès d'acide sulfurique pouvant atteindre au moins 0,5 ml ne fait pas varier de façon sensible les potentiels d'équivalence repérés. Pour le brome, cette neutralisation doit être effectuée en refroidissant la solution dans un bain de glace pour éviter la formation de bromates[17]. Quant à l'iode, qui est presque quantitativement transformé en iodate, il est réduit en iodure, après neutralisation, par chauffage au bain-marie pendant 15 minutes à 100° C en présence de 100 mg de sulfate d'hydrazine analytiquement pur[5]; on titre l'iodure formé dans cette solution après refroidissement.

2° *Repérage des potentiels d'équivalence et titration des halogènes d'un composé organique après minéralisation et solubilisation.*

Les opérations de repérage des potentiels d'équivalence ou de titrage des halogènes minéralisés se conduisent de façon semblable, comme on l'a déjà vu ; leur sensibilité est fonction, en dernière analyse, des titres des solutions de nitrate d'argent et des types de burettes qu'il est possible d'employer.

Titres des solutions de nitrate d'argent et burettes. On emploie, pour le titrage du chlore, une solution de nitrate d'argent 0,01 N. Cette concentration permet d'une part d'opérer à l'échelle microanalytique (prise d'essai oscillant autour de 5 mg suivant sa teneur en chlore) et, d'autre part, d'obtenir une sensibilité de mesure potentiométrique, c'est-à-dire une variation de potentiel suffisante de l'électrode indicatrice au point équivalent, lorsqu'on ajoute, à la solution à titrer, 0,025 ml (une goutte de semi-microburette) de la solution de nitrate d'argent.

Pour le titrage du brome ou de l'iode, on a employé avec la même semi-microburette une solution de nitrate d'argent 0.002 N ; dans le cas de l'iode, la sensibilité de la mesure potentiométrique est telle qu'il serait possible soit d'employer une solution de nitrate d'argent plus diluée, soit d'employer une microburette délivrant des gouttes de volume inférieur à 0.025 ml.

Les semi-microburettes doivent être automatiques ou semi-automatiques pour accélérer les opérations de titration ; celles qui ont été utilisées pour ce travail sont graduées en vingtième de ml et permettent l'appréciation du centième de ml ; la possibilité de fractionner les gouttes est suffisante lorsqu'on utilise, pour les solutions de nitrate d'argent, les concentrations indiquées précédemment, pour permettre d'effectuer des dosages précis, dans les conditions générales correspondant au mode opératoire global adopté.

Volume final de titration. Dans les deux cas du repérage des potentiels d'équivalence et du titrage proprement dit, on dilue la solution de la cellule de titration avec de l'eau bidistillée exempte d'halogène lorsque le point équivalent est presque atteint, à un *volume final* de titration de 80 ml.

Repérage des potentiels d'équivalence. Lors du repérage des potentiels d'équivalence, la dilution au volume final de titration est effectuée après avoir introduit dans la solution de la cellule de titration un volume de nitrate d'argent inférieur de $1\ c - 0.5$ ml au volume équivalent calculé.

Il est d'autre part possible de simplifier et de rendre beaucoup plus rapide le mode opératoire de repérage des potentiels d'équivalence.

A cet effet, on opère de la façon suivante :

1° on prépare dans la cellule de titration une solution contenant 12 g de sulfate de sodium décahydraté non effleuri* en 40 ml d'eau bidistillée,

* Cette quantité de sulfate de sodium, pesée sur un trébuchet 0,01 g près, ou mesurée dans une cuiller de capacité correspondante, correspond à la neutralisation par l'acide sulfurique des 3 g de peroxyde de sodium introduits dans la microbombe.

exempte d'halogène, à laquelle on ajoute, suivant les cas, 10 ml d'une solution titrée de chlorure de potassium 0,01 N ou de bromure de potassium 0,002 N ou d'iodate de potassium 0,002 M, puis une goutte de l'acide sulfurique utilisé pour les neutralisations.

2° Dans le cas de l'iode, on réduit l'iodate de potassium par 100 mg de sulfate d'hydrazine en chauffant la solution obtenue pendant 15 minutes au bain-marie à 100° C. On pourrait éviter cette opération de réduction en introduisant directement dans la cellule de titration 10 ml d'une solution titrée d'iodure de potassium 0,002 N au lieu d'iodate 0,002 M: on a cependant intérêt à conserver l'iodate à cause de l'instabilité de la solution d'iodure.

3° On repère les potentiels d'équivalence à l'aide de la cellule ainsi préparée comme dans le cas déjà décrit ou l'on opère par pesée des réactifs (KCl, KBr ou IO_3K) et attaque à la microbombe.

L'expérience montre que les potentiels d'équivalence de l'électrode indicatrice ainsi repérés sont indépendants du mode opératoire employé dans chacun des trois cas considérés.

Titrage des halogènes. Lors du titrage des halogènes, le moment où doit être effectuée la dilution de la solution de la cellule de titration au volume final est indiqué par les déplacements de l'aiguille du microampèremètre. Celui-ci a une échelle dont le plan est vertical et il peut se placer au niveau de l'oeil de sorte que pendant toute la titration on peut suivre facilement les déviations de l'aiguille.

L'échelle d'une longueur de 10 cm est graduée en 50 divisions dont on peut apprécier le dixième: le zéro est à la dixième division: la graduation est marquée toutes les dix divisions à gauche et à droite du zéro ce qui facilite les mesures.

Quel que soit l'halogène à titrer, la différence de potentiel aux bornes du potentiomètre est préalablement réglée à une valeur égale à la force électromotrice d'équivalence de la cellule de titration pour l'halogène considéré. On commence alors à introduire le nitrate d'argent dans la cellule de titration, le potentiomètre étant sur la position «Mesures» (fig. 3) la clé de shunt fermée et le rhéostat du shunt réglé à une résistance telle que l'aiguille du microampèremètre soit au voisinage de sa déviation maximum (à droite du zéro) vers la graduation 40. On augmente la résistance du shunt dès que l'aiguille commence à dévier de façon à ce qu'elle reste au voisinage de l'extrémité droite de l'échelle. Quand la résistance du shunt a atteint sa valeur maximum, on ouvre alors la clé de shunt (sensibilité maximum de l'appareil de mesure).

S'il s'agit du chlore ou du brome, l'aiguille étant toujours au voisinage de l'extrémité droite de l'échelle, on effectue à ce moment la dilution de la solution de la cellule de titration à 80 ml (niveau de la pointe repère *L*, fig. 1) puis continue à ajouter le nitrate d'argent goutte à goutte jusqu'à

ce que l'aiguille du microampèremètre soit sur la graduation zéro. Pour le chlore, la stabilisation de l'aiguille est quasi instantanée après chaque addition de nitrate d'argent. Pour le brome, il n'en est pas de même: le potentiel de l'électrode indicatrice croit tout d'abord puis décroit lentement jusqu'à une valeur stable; tout se passe comme s'il y avait d'abord sursaturation de la solution en bromure d'argent (croissance du potentiel) puis précipitation de ce sel jusqu'à ce que la saturation soit atteinte (décroissance du potentiel); au voisinage du point équivalent il faut attendre 2 à 3 minutes avant que le potentiel soit complètement stabilisé.

Dans le cas de l'iode, on commence la titration comme pour le chlore et le brome, l'aiguille du microampèremètre étant au voisinage de l'extrémité droite de l'échelle; elle y reste immobile jusqu'à ce qu'il reste à introduire environ 0,5 ml de nitrate d'argent pour d'atteindre le point équivalent. Elle commence alors à se rapprocher lentement du zéro; on dilue la solution à titrer à 80 ml et on continue ensuite à ajouter le nitrate d'argent goutte à goutte, très lentement, en attendant après chaque addition que l'aiguille du microampèremètre soit stabilisée; on ne passe à la sensibilité maximum du microampèremètre que lors de l'addition de la dernière goutte de nitrate d'argent (ou supposée telle). La stabilité de l'aiguille coincide avec l'apparition des grumeaux d'iodure d'argent, la durée totale de la stabilisation lors de l'addition des dernières gouttes de nitrate d'argent est de l'ordre de grandeur de 5 minutes.

Il est remarquable que le phénomène connu d'adsorption des ions J^- et Ag^+ par l'iodure d'argent qui nécessite d'opérer à chaud si l'on veut faire des titrations précises[19] n'intervient pas de façon sensible dans les conditions opératoires particulières du présent travail.

En définitive, et dans tous les cas le volume total de nitrate d'argent introduit dans la cellule de titration lorsque l'aiguille du microampèremètre indique zéro est le volume équivalent v.

Calculs. La teneur en halogènes de l'échantillon soumis à l'analyse exprimée en grammes pour cent grammes de produit se calcule par l'une des trois formules suivantes:

$$\text{Chlore } \% = 35{,}457 \frac{v}{m}$$

$$\text{Brome } \% = 15{,}983 \cdot \frac{v}{m}$$

$$\text{Iode } \% = 25{,}384 \frac{v}{m}$$

Dans ces formules v est le volume équivalent de nitrate d'argent 0,01 N pour le chlore, 0,002 N pour le brome et pour l'iode, exprimé en ml; m est la masse de la prise d'essai du composé organique soumis à l'analyse exprimée en mg.

IV. Résultats-Discussion.

Dans ce paragraphe on donnera et discutera les résultats numériques obtenus pour le repérage des points équivalents des dosages des trois halogènes considérés, les durées respectives de ces dosages et enfin les teneurs en halogènes trouvées pour des séries de composés chlorés, bromés et iodés, comparativement aux valeurs théoriques.

Repérage des points équivalents. Les valeurs numériques des forces électromotrices de la cellule de titration au point équivalent sont normalement repérées par lectures des déviations de l'aiguille du microampèremètre dans les conditions qui ont été décrites; elles sont alors exprimées en unités arbitraires. Afin de rendre ces valeurs plus significatives, on a établi le coefficient de transformation de ces lectures en millivolts (par étalonnage comparatif avec des forces électromotrices connues).

Les résultats qui suivent sont exprimés en unités arbitraires correspondant à la graduation de l'échelle du microampèremètre et suivis (entre parenthèses) de leurs valeurs exprimées en millivolts.

Il est intéressant de comparer les résultats expérimentaux trouvés aux résultats théoriques dans le cas de solutions pures et, dans le cas de solutions fortement salines, de montrer l'influence de la concentration de sulfate de sodium sur la valeur absolue de la force électromotrice d'équivalence de la cellule de titration, et par conséquent, sur le volume équivalent de nitrate d'argent.

La formule classique

$$E_{Cl} = 0{,}81 + 0{,}06 \log [Ag^+]$$

permet de calculer le potentiel de l'électrode d'argent au point équivalent de précipitation de l'ion Cl^- par l'ion Ag^+; en effet le produit de solubilité $[Ag^+] \times [Cl^-]$ étant égal à 10^{-10} il en résulte qu'au point équivalent $[Ag^+] = [Cl^-] = 10^{-5}$. Il vient donc:

$$E_{Cl} = 0{,}81 + 0{,}06 \log (10^{-5}) = 0{,}510 \text{ volts} = 510 \text{ millivolts.}$$

C'est le potentiel de l'électrode d'argent par rapport à l'électrode normale à hydrogène; le potentiel de l'électrode au calomel étant dans les mêmes conditions, 250 millivolts, il en résulte que pour une solution pure de chlorure de potassium, par exemple, la force électromotrice de la cellule de titration serait au point équivalent:

$$e_{Cl} = 510 - 250 = 260 \text{ millivolts}$$

D'autre part, le repérage de la force électromotrice d'équivalence de la cellule de titration contenant 10 ml de chlorure de potassium 0,01 N ultérieurement dilué et exactement précipité par 10 ml de nitrate d'argent 0,01 N donne 20,3 unités du microampèremètre (259,8 millivolts) soit aux erreurs d'expérience près la valeur théorique; en présence de sulfate

de sodium (12 g de SO_4Na_2, 10 H_2O en 80 ml de solution au point équivalent) cette force électromotrice n'est plus que de 19,9 unités du microampèremètré (254,7 millivolts) soit une chute de 0,4 unités du microampèremètre (5,1 millivolts) valeur qui est sensiblement égale, au signe près, à l'élévation de potentiel qui serait dûe à l'addition d'un excès d'une goutte de nitrate d'argent 0,01 N à la cellule de titration réelle au point équivalent.

Pour le brome, le produit de solubilité du bromure d'argent est égal à 10^{-12} le calcul donne pour le potentiel de l'électrode indicatrice au point équivalent :

$$E_{Br} = 450 \text{ millivolts}$$

soit pour la force électromotrice d'équivalence de la cellule de titration (solution pure)

$$e_{Br} = 450 - 250 = 200 \text{ millivolts}$$

on trouve pratiquement pour la force électromotrice d'équivalence de la cellule de titration contenant 10 ml de bromure de potassium 0,002 N ultérieurement dilué et exactement précipité par 10 ml de nitrate d'argent 0,002 N une moyenne de 15 unités du microampèremètre (192 millivolts) valeur voisine de la valeur théorique et, en présence de sulfate de sodium (12 g de SO_4Na_2 10 H_2O en 80 ml de solution au point équivalent) une moyenne de 13,8 unités du microampèremètre (176,8 millivolts), soit une chute de 1,2 unité du microampèremètre ; or l'élévation de potentiel dûe à l'addition d'un excès d'une goutte de nitrate d'argent 0,002 N à la cellule de titration réelle au point équivalent est de 0,3 à 0,4 divisions (3,8 à 5,1 millivolts) ; pour le brome l'effet de la présence du sulfate de sodium est donc beaucoup plus important que pour le chlore puisque l'abaissement de potentiel qu'il provoque, par rapport à la solution pure, au point équivalent correspond à un défaut de 3 à 4 gouttes de nitrate d'argent 0,002 N.

Il convient, en outre, de remarquer que les écarts constatés entre les forces électromotrices des cellules de solutions pures de chlorure ou de bromure de potassium et les forces électromotrices des cellules réelles seraient encore accrus si l'on négligeait l'opération de dilution finale.

Pour l'iode, le produit de solubilité de l'iodure d'argent étant égal à 10^{-16} le calcul donne pour le potentiel de l'électrode indicatrice au point équivalent

$$E_J = 330 \text{ millivolts}$$

soit pour la force électromotrice d'équivalence de la cellule de titration (solution pure)

$$e_J = 330 - 250 = 80 \text{ millivolts}$$

la force électromotrice d'équivalence d'une cellule réelle (en présence de sulfate de sodium) au point équivalent a été trouvée en moyenne

égale à 15,6 divisions de microampèremètre (199,7 millivolts) ce qui est déjà supérieur à la force électromotrice théorique calculée ci-dessus et atteint même celle d'une cellule à solution de bromure de potassium pur; ceci est dû au saut considérable de potentiel qui accompagne pour l'iode le passage par le point équivalent; la goutte antérieure de nitrate d'argent 0,002 N donne en effet pour la force électromotrice d'équivalence de la cellule une valeur de l'ordre de grandeur de la force électromotrice théorique de 80 millivolts obtenue pour une solution pure d'iodure de potassium; cette force électromotrice correspondrait à environ 6,2 unités du microampèremètre; dans la pratique on peut prendre pour effectuer le titrage toute force électromotrice comprise entre 7,5 divisions du microampèremètre (96 millivolts) et 18 divisions du microampèremètre (230,4 millivots); on a choisi la force électromotrice de 13,8 divisions du microampèremètre (176,8 millivolts) qui est la même que pour le brome.

En résumé on adopte comme valeurs de repérage des potentiels:

19,9 divisions du microampèremètre soit environ 255 millivolts pour le dosage du chlore

13,8 divisions du microampèremètre soit environ 177 millivolts pour le dosage du brome et de l'iode.*

Titrage des halogènes. Des résultats et des discussions qui précèdent il semble à première vue que les titrages du chlore et du brome soient délicats. En effet, l'addition à la cellule de titration au point équivalent d'une goutte de la solution de nitrate d'argent correspondante ne fait varier la force électromotrice repérée que de 0,4 division de l'échelle du microampèremètre.

En réalité quand le titrage est effectué le titrimètre est sur la position «Mesures» (fig. 3); dans ces conditions lorsque le microampèremètre est à sa sensibilité maximum, la tension de sortie de l'amplificateur électronique est directement appliquée à ses bornes; le coefficient d'amplification étant connu (0,7) on peut calculer qu'un dixième de division du microampèremètre sur la position «Repérage des potentiels» (fig. 4) correspond sensiblement à une division sur la position «Mesures» (fig. 3); l'addition d'une goutte de nitrate d'argent (0,01 N pour le chlore; 0,002 N pour le brome) correspond donc à une déviation d'environ 4 divisions sur la position «Mesures» ce qui permet de déterminer facilement et avec précision le volume équivalent de nitrate d'argent par le retour de l'aiguille du microampèremètre à zéro.

On voit donc que la sensibilité de la méthode est équivalente pour les dosages du chlore et du brome si l'on utilise pour le premier une solution

* Ces valeurs sont données à titre purement indicatif; le repérage des f. e. m. d'équivalence devant toujours être effectué expérimentalement avec un appareillage donné.

de nitrate d'argent 0,01 N et pour le second 0,002 N, dans les conditions opératoires précédemment définies.

Cette sensibilité est bien supérieure pour l'iode: l'addition d'une goutte de nitrate d'argent provoque sur la position «Mesures» une déviation de l'aiguille du microampèremètre qui est supérieure à toute l'échelle graduée de cet appareil.

Il n'est cependant pas utile d'essayer de la mettre à profit soit en employant une solution de nitrate d'argent plus diluée, soit en employant une burette plus précise, car les erreurs inhérentes au mode opératoire global rendraient illusoire le gain de précision obtenu sur le titrage seul.

Durée des dosages. On se propose d'établir la durée d'un dosage total depuis la pesée initiale de l'échantillon jusqu'au calcul final du résultat: il convient toutefois de distinguer la durée d'un dosage isolé et la durée d'un dosage faisant partie d'une série.

La méthode de minéralisation de la substance dans la microbombe de *Parr* tout comme la méthode potentiométrique de titrage se prêtent en effet aux opérations en série. Dans ce cas, il est nécessaire de disposer d'un certain nombre de microbombes et d'étriers de serrage pour éviter toute perte de

Tableau I. Durées des dosages isolés.

	Temps en minutes		
	Chlore	Brome	Iode
1° Pesée	12[1]	12[1]	12[1]
2° Préparation de la microbombe (introduction de la substance, des réactifs, etc... fermeture)	2	2	2
3° Minéralisation (combustion par chauffage sur microflamme)	3	3	3
4° Refroidissement de la bombe (dans l'eau)	5	5	5
5° Solubilisation	5	5	5
6° Neutralisation (par l'acide sulfurique en refroidissant dans le cas du brome)	3	5	3
7° Réduction (par le sulfate d'hydrazine dans le cas de l'iode seulement)	0	0	15
8° Titration	6[2]	10[2]	12[2]
Totaux ...	36	42	57

Notes relatives au Tableau I:

[1] Les temps de pesée correspondent à une microbalance non amortie; ces temps peuvent être notablement réduits si l'on dispose d'une microbalance amortie.

[2] Les différences des durées de titration pour le chlore, le brome et l'iode sont dues aux temps nécessaires à la stabilisation du potentiel au voisinage du point équivalent, temps qui croissent du chlore au brome et du brome à l'iode.

temps; les opérations de dosage s'imbriquant alors les unes dans les autres, on peut faire disparaître complètement les temps morts concernant la minéralisation et la solubilisation de la substance organique. On commence par minéraliser et solubiliser une série d'échantillons de façon à obtenir une série de béchers contenant les solutions à titrer. Ces solutions sont successivement titrées sans discontinuité et sans temps mort, par la méthode des potentiels repérés.

On donnera les temps nécessaires à un dosage isolé (tableau I) et, à titre d'exemple, les temps nécessaires à une série de douze dosages (impliquant l'utilisation de douze microbombes avec leurs étriers de serrage (tableau II).

On a vu que la méthode gravimétrique associée à la minéralisation dans la microbombe de *Parr* nécessite un temps total de dosage des halogènes atteignant 110 minutes. L'examen du tableau I montre que l'emploi de la méthode de dosages potentiométriques des halogènes par potentiels repérés permet un gain de temps de l'ordre de grandeur d'environ 50% pour l'iode, 60% pour le brome et 70% pour le chlore.

Durées de dosages en série. Pour le cas de dosages en série il est nécessaire d'établir un programme de travail; il figure, pour une série de douze dosages, prise comme exemple, avec les temps correspondants, dans le tableau suivant.

L'examen du tableau II montre que:

12 dosages de chlore sont effectués en 5 heures 6 minutes, soit environ 25,5 minutes par dosage unitaire (gain de 10,5 minutes sur un dosage isolé);

12 dosages de brome sont effectués en 6 heures 24 minutes, soit 32 minutes par dosage unitaire (gain de 10 minutes sur un dosage isolé);

12 dosages d'iode sont effectués en 6 heures 39 minutes, soit 33,3 minutes par dosage unitaire (gain de 23,7 minutes sur un dosage isolé).

Si l'on disposait d'un nombre moindre de bombes, le programme de travail et les temps correspondants pourraient se conserver mais en ajoutant un faible temps partiel supplémentaire correspondant au séchage des bombes devant etre réutilisées; cette opération peut être d'ailleurs rapidement réalisée dans une étuve à 100° C.

Résultats de dosage des halogènes dans les composés organiques.

On a effectué des séries de dosage de chlore, de brome et d'iode dans des composés organiques purs. Ces composés, liquides ou solides ont des teneurs en halogènes très variables, les résultats obtenus figurent dans les tableaux III, IV et V.

L'examen de ces trois tableaux montre la précision que l'on est en droit d'attendre de la méthode potentiométrique de dosage des halogènes dans les composés organiques lorsqu'on l'associe à la méthode de minéralisation dans la microbombe de *Parr*. Les erreurs absolues

commises sont en moyenne inférieures à $\pm 0{,}20\%$ de produit brut. On voit que les masses des prises d'essais peuvent varier entre de très larges limites.

Tableau II. Programme de travail.

Nature des opérations				Temps en minutes		
Pesée	Minéralisation[1]	Refroidissement[2]	Solubilisation	Chlore	Brome	Iode
1ère				12	12	12
2ème	1ère			12	12	12
3ème	2ème	1er		12	12	12
4ème	3ème	2ème		12	12	12
5ème	4ème	3ème		12	12	12
6ème	5ème	4ème		12	12	12
7ème	6ème	5ème		12	12	12
8ème	7ème	6ème		12	12	12
9ème	8ème	7ème		12	12	12
10ème	9ème	8ème		12	12	12
11ème	10ème	9ème		12	12	12
12ème	11ème	10ème		12	12	12
	12ème	11ème	1ère et 2ème	10	10	10
		12ème	3ème et 4ème	10	10	10
			5ème et 6ème	10	10	10
			7ème et 8ème	10	10	10
			9ème et 10ème	10	10	10
			11ème et 12ème	10	10	10
12 neutralisations				30[3]		
12 neutralisations (avec refroidissement)					60	
6 neutralisations						15[3]
6 neutralisations						18
6 réductions par le sulfate d'hydrazine[4] (au bain-marie)						
6 réductions par le sulfate d'hydrazine						18
6 refroidissements						
12 titrations				72	120	
6 refroidissements						144
12 titrations						
			Temps totaux	306	384	399

Notes relatives au Tableau II:

[1] Dans la rubrique «minéralisation» sont comprises les opérations de préparation de la bombe et la minéralisation proprement dite. Cette dernière opération se fait sans surveillance par chauffage de la bombe serrée dans son étrier[17]; ce chauffage peut être prolongé sans inconvénient pendant une dizaine de minutes jusqu'à disponibilité de l'opérateur.

[2] Le refroidissement se fait dans l'eau sans surveillance de l'opérateur[17].

[3] Les neutralisations en série permettent d'abaisser le temps unitaire pour chacune d'elles.

[4] La quantité de sulfate d'hydrazine (100 mg) est mesurée à l'aide d'une petite cuiller.

Tableau III. Dosage du chlore.

Substance analysée	Prise d'essai mg	Nitrate d'argent 0,01 N ml	% Chlore Trouvé	% Chlore Calculé	Erreur absolue
Acide chloro-8 benzo-6-7 phényl-2-cinchoninique (solide) (1)	5,509	1,67	10,74	10,62	— 0,12
	4,649	1,44	10,98		+ 0,36
α Chloro naphtisatine (solide) (1)	7,473	3,26	15,46	15,30	+ 0,16
	9,090	3,89	15,17		— 0,13
Chloro-9-aza-1-anthracène (solide) (1)	8,576	3,95	16,33	16,59	0,26
	8,265	3,87	16,60		+ 0,01
Chloro acétanilide (solide) (7)	9,039	5,36	21,02	20,94	+ 0,08
	7,836	4,61	20,88		— 0,06
	8,251	4,85	20,84		— 0,10
	8,606	5,05	20,80		— 0,14
Chlorobenzène (liquide) (7)	6,127	5,46	31,61	31,55	0,06
	7,079	6,25	31,35		— 0,20
Acide dichloro phénoxy-acétique (solide) (7)	8,288	7,45	31,87	32,06	— 0,19
	8,969	8,10	32,02		— 0,04
	6,370	5,73	31,90		— 0,16
Acide dichloro benzoïque-1-2-4 (solide) (1)	5,552	5,82	37,17	37,12	— 0,05
	8,093	8,48	37,15		+ 0,03
Polychlorure de vinyle (solide) (2)	5,126	8,25	57,07	56,8	+ 0,27
	4,126	6,65	57,05		— 0,25
	4,614	7,40	56,87		+ 0,07
Hexachlorocyclohexane (solide) (7)	4,757	9,78	72,92	73,14	— 0,22
	5,963	12,24	72,80		— 0,34
Pentachlorethane (liquide) (7)	11,318	27,98	87,66	87,63	+ 0,03
	6,152	15,24	87,84		+ 0,21
Hexachlorethane (solide) (6)	5,713	14,53	90,18	89,86	+ 0,32
	2,752	6,83	89,29		— 0,57

Tableau IV. Dosage du brome.

Substance analysée	Prise d'essai mg	Nitrate d'argent 0,002 N ml	% Brome Trouvé	% Brome Calculé	Erreur absolue
Bromo-1-diphényl 2-3-indène (solide) (1)	4,347	6,25	22,97	23,01	— 0,04
	5,452	7,82	22,92		— 0,08
Acide parabromobenzoyl-propionique (solide) (7)	5,710	11,12	31,12	31,08	+ 0,04
	4,500	8,75	31,07		— 0,01
Bromocamphre (solide) (7)	6,897	14,88	34,48	34,57	— 0,09
	7,619	16,35	34,30		— 0,27
	3,579	7,72	34,47		— 0,10

Continuation du tableau III.

Substance analysée	Prise d'essai mg	Nitrate d'argent 0,002 N ml	% Brome		Erreur absolue
			Trouvé	Calculé	
Amino-6-bromo-x tétraline (solide) (3)	6,651	14,68	35,27	35,34	— 0,07
	5,003	11,03	35,23		— 0,11
	3,195	7,05	35,26		— 0,08
Acide parabromobenzoïque (solide) (1)	3,347	8,40	40,01	39,75	+ 0,26
	4,377	10,91	39,89		— 0,14
Bromo-4-orthoxylène (liquide) (3)	6,615	17,84	43,10	43,18	— 0,08
	7,675	20,75	43,21		+ 0,03
	3,517	9,50	43,17		— 0,01
Dibromochalcone (solide) (5)	6,470	17,58	43,42	43,44	— 0,02
	5,285	14,30	43,24		— 0,20
	2,794	7,57	43,30		— 0,14
Dibromo-9-10-anthracène (solide) (3) (1)	4,832	14,38	47,56	47,56	0
	2,690	7,98	47,41		— 0,15
	4,095	12,14	47,38		— 0,18
Bromobenzène (liquide) (1)	2,295	7,28	50,69	50,90	— 0,21
	3,119	9,91	50,78		— 0,12

Tableau V. Dosage de l'iode.

Substance analysée	Prise d'essai mg	Nitrate d'argent 0,002 N ml	% Iode		Erreur absolue
			Trouvé	Calculé	
Iodoéthylate de cinchonine (solide) (1)	7,543	8,31	27,96	28,18	— 0,22
	4,659	5,15	28,05		— 0,13
Bis iodométhylate du bis [métadimethylamino-phenyl] phényléthylenyl-carbinol (solide) (1)	6,257	9,55	38,74	38,79	— 0,05
	5,589	8,45	38,39		— 0,40
Iodoxybenzène (solide) (4)	2,668	5,69	54,13	53,77	+ 0,36
	3,468	7,32	53,57		— 0,20
Paraiodotoluène (solide) (4)	4,339	9,95	58,20	58,20	0
	2,498	5,70	57,92		— 0,28
Thyroxine (solide) (Hoffmann la Roche, Bâle)	5,318	13,68	65,29	65,36	+ 0,10
	6,293	16,23	65,46		— 0,07
	3,345	8,64	65,56		+ 0,20
Diiodo-3-6-nitrobenzène (solide) (4)	2,875	7,65	67,54	67,70	0,16
	2,552	6,82	67,83		+ 0,13
Iodure de n-butyle (liquide) (4)	6,185	16,65	68,33	68,43	— 0,10
	2,728	7,34	68,29		— 0,14

On voit, en outre, que cette méthode, appliquée au dosage de l'iode peut concurrencer la méthode iodométrique déjà citée de *Elek* et *Harte*[7]; elle a l'avantage d'être identique aux méthodes de dosage du chlore et du brome et de ne nécessiter que le même réactif de titration.

Les dosages dont les résultats figurent dans les tableaux précédents ont été effectués en même temps que des analyses courantes confiées à la Section de Microanalyse du Laboratoire Municipal de Paris; ils ont été exécutés par *M. Bernard Cousin*, collaborateur technique de l'auteur du présent travail qui l'en remercie très amicalement.

Les composés analysés ont été pour la plupart gracieusement mis à la disposition de l'auteur qui les en remercie très vivement par les organismes suivants:

(1) Collège de France-Laboratoire de Chimie Organique.

(2) Compagnie de Saint-Gobain — Direction des laboratoires de recherches organiques.

(3) Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris — Laboratoire de Perfectionnement.

(4) Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris — Laboratoire d'Enseignement de Chimie Organique.

(5) Faculté de Pharmacie de Paris — Laboratoire de chimie organique.

(6) Institut Catholique de Paris — Laboratoire de chimie organique.

(7) Laboratoire Municipal de Paris — Service de recherches scientifiques.

Les numéros affectés à chacun de ces organismes sont reproduits entre parenthèses dans les tableaux III, IV et V après les noms de chacun des composés analysés pour en indiquer l'origine.

V. Addendum.

Il convient de remarquer, bien que ce ne soit pas l'objet précis de la présente communication, que la méthode d'argentométrie potentiométrique par potentiels repérés s'applique d'une façon remarquable au semi-microdosage des halogènes après minéralisation dans la bombe de *Parr*. Il suffit de transposer purement et simplement la méthode décrite à l'échelle semi-microanalytique. Les prises d'essais peuvent être alors uniformément de l'ordre de grandeur de 20 à 30 mg. On emploie une solution de nitrate d'argent 0,02 N mesurée dans une macroburette, dans le cas du chlore, et dans une semi-microburette dans le cas du brome et de l'iode.

Résumé.

Une méthode des plus simples et des plus rapides de minéralisation des composés organiques en vue du dosage des halogènes est sans aucun doute l'attaque de ces substances par le peroxyde de sodium dans la microbombe de *Parr*.

Il convenait de lui associer une méthode ayant des qualités comparables pour le dosage ultérieur des halogènes ainsi minéralisés.

La gravimétrie des précipités d'halogénures d'argent est longue et délicate et les facteurs de calcul deviennent défavorables pour le brome et surtout pour l'iode.

Les méthodes volumétriques argentométriques sont rendues difficiles ou impossibles du fait de la haute concentration en sels des solutions d'ions halogènes.

L'argentométrie potentiométrique a permis de doser à l'échelle semi-microanalytique les ions chlore et brome avec une solution de nitrate d'argent 0,02 N mesurée dans une macroburette. La haute concentration en sels ne permet pas, lorsqu'on utilise la méthode potentiométrique habituelle, de faire des dosages à l'échelle microanalytique; en outre cette méthode est encore de durée relativement longue.

La méthode des potentiels d'équivalence repérés utilisée par l'auteur permet les dosages à l'échelle microanalytique de l'ion chlore avec une solution de nitrate d'argent 0,01 N. et des ions brome et iode avec une solution de nitrate d'argent 0,002 N, ces solutions étant mesurées dans une semi-microburette. Le faible titre de la solution de nitrate d'argent employée permet à cette méthode de concurrencer, pour l'iode, la méthode iodométrique au thiosulfate de sodium 0,01 N où l'on dose 6 équivalents d'iode pour un seul à déterminer. Cette méthode est, en outre, beaucoup plus rapide que les autres méthodes volumétriques y compris la méthode potentiométrique habituelle, et se prête, comme la minéralisation à la microbombe, aux dosages en grande série.

Zusammenfassung.

Eine der einfachsten und raschesten Methoden der Veraschung organischer Substanzen für die Bestimmung der Halogene ist ohne Zweifel die mit Natriumperoxyd in der *Parr*-Bombe. Es scheint zweckmäßig, sie mit einem ebenso zufriedenstellenden Verfahren für die eigentliche Halogenbestimmung zu kombinieren. Die Gravimetrie der Silberhalogenide ist langwierig und mißlich und deren Umrechnungsfaktoren insbesondere für Brom und Jod recht ungünstig. Die argentometrische Maßanalyse ist entweder schwierig oder gar nicht durchführbar in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Im Halbmikromaßstab lassen sich Chlor und Brom mittels 0,02-n-Silbernitratlösung und Verwendung einer Makroburette potentiometrisch titrieren. Hohe Salzkonzentration verhindert jedoch nach dem üblichen Verfahren den Übergang zum Mikromaßstab; im übrigen ist auch dieses Verfahren relativ langwierig. Die vom Verfasser angewendete Methode der gekennzeichneten Gleichgewichtspotentiale ermöglicht die maßanalytische Bestimmung der Chlorionen mittels 0,01-n-Silbernitrat, der Brom- und Jodionen mittels 0,002-n-Silbernitrat, wobei für diese Lösungen Halbmikrobüretten verwendet werden. Der niedere Titer der angewendeten Silberlösung läßt diese Methode der Jodbestimmung dem Multiplikationsverfahren mit 0,01-n-Thiosulfat gleichwertig erscheinen. Sie ist im übrigen viel rascher ausführbar als sonst übliche volumetrische und auch potentiometrische Methoden und läßt sich, kombiniert mit dem *Parr*-Verfahren, zur Serienbestimmung verwenden.

Summary.

One of the most simple and most rapid methods of mineralizing organic compounds for the purpose of determining halogens is doubtless the attack of these materials by sodium peroxyde in the *Parr* microbomb.

A method having comparable qualities for the subsequent determination of the halogens thus mineralized is described here.

The gravimetric determination of silver halide precipitates is long and delicate, and the factors become unfavorable for bromine and especially for iodine. The argentometric volumetric methods are made difficult or impossible because of the high concentration of salts in the halide solutions.

Potentiometric argentometry provides a method of determining chloride and bromide on a semi-microanalytical scale by means of 0,02 N silver nitrate solution added from a macroburette. When the usual potentiometric method is employed, the high concentration of salts does not permit determinations on the microanalytical scale; furthermore this method still requires a considerable expenditure of time.

The method of equivalence potentiale, used by the author, permits the determination, on the microanalytical scale, of chloride with 0,01 N silver nitrate solution, and of bromide and iodide with 0,002 N silver nitrate. These solutions are measured in a semi-microburette. The low titre of the silver nitrate solution used allows this method to compete for iodide, with the iodometric method (when 0,01 N sodium thiosulfate is used) where six equivalents are titrated for each equivalent being determined. Moreover, the present method is faster then the other volumetric methods including the ordinary potentiometric method, and lends itself, like the mineralization in the microbomb, to series determinations.

Bibliographie.

[1] *W. Zimmermann*, Mikrochem. **31**, 149 (1943).
[2] *W. Zimmermann*, Mikrochem. **31**, 42 (1943).
[3] *W. Zimmermann*, Z. analyt. Chem. **118**, 258 (1939).
[4] *W. Zimmermann*, Mikrochem. **31**, 15 (1943).
[5] *A. Elek* et *W. D. Hill*, J. Amer. Chem. Soc. **55**, 2550 (1933).
[6] *J. B. Niederl* et *V. Niederl*, Micromethods of quantitative organic analysis, Deuxième édition, John Wiley and Sons, New York, p. 167.
[7] *A. Elek* et *R. A. Harte*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **9**, 502 (1937).
[8] *W. W. Scott*, Standard Methods of Chemical Analysis, 5ème édition, D. Van Nostrand Co., New York, p. 2498.
[9] *E. W. Peel*, *R. H. Clark* et *E. C. Wagner*, Ind. Engng. Chem. Analyt. Ed. **15**, 149 (1943).
[10] *I. M. Kolthoff*, *W. M. Lauer* et *C. J. Sunde*, J. Amer. Chem. Soc. **51**, 3273 (1929).
[11] *E. Zintl* et *K. Betz*, Z. analyt. Chem. **74**, 330 (1928).
[12] *W. Zimmermann*, Conférence (Paris, Octobre 1947) et communication particulière.
[13] *W. D. Treadwell* et *L. Weiss*, Helv. Chim. Acta **2**, 680 (1919).
[14] *J. Pinkhof*, Dissertation Amsterdam 1919.
[15] *E. Müller*, Die Elektrometrische (Potentiometrische) Maßanalyse, 6ème édition. Theodor Steinkopff, Dresden und Leipzig 1942, p. 90.
[16] *P. Bellamy*, Chim. analyt. **30**, 82 (1948).
[17] *B. Wurzschmitt* et *W. Zimmermann*, Die Metallbombe als Hilfsmittel in der Elementaranalyse. Fortschritte der chemischen Forschung, Bd. I, Heft 3, Springer, Heidelberg 1950.
[18] *G. Charlot* et *D. Bezier*, Méthodes modernes d'analyse quantitative minérale, 2ème édition, Masson, Paris 1949.
[19] *I. M. Kolthoff* et *J. J. Lingane*, J. Amer. Chem. Soc. **58**, 1524 (1936).

Aus dem Untersuchungslaboratorium der Badischen Anilin- und Soda-Fabrik, Ludwigshafen a. Rh.

Ein neues Schnellaufschlußverfahren mit Alkaliperoxyd in einer Universalbombe für Mikro-, Halbmikro- und Makroeinwaagen.

Von

Bernhard Wurzschmitt.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 21. August 1950.)

In einer Ende Oktober 1949 abgeschlossenen Arbeit[1] habe ich zusammen mit meinem ehemaligen Mitarbeiter *W. Zimmermann* über unsere mehr als 15jährigen eigenen praktischen Erfahrungen, über die bisherige Entwicklung und den damaligen Stand der Verwendung der Metallbombe zum Natriumperoxydaufschluß organischer Substanzen als Hilfsmittel in der Elementaranalyse zusammenfassend berichtet.

Dieses elegante Verfahren wurde zuerst von *Pringsheim*[2] Ende 1903 zur raschen, billigen und sauberen Bestimmung von Halogenen vorgeschlagen. Die Makro-Substanzeinwaage (etwa 0,2 g) wurde dabei mit einem vom Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt der zu untersuchenden Probe abhängigen Überschuß an Natriumperoxyd und bei einem Gehalt von weniger als 50% Kohlenstoff und Wasserstoff auch noch mit einer organischen Hilfssubstanz, z. B. Zucker, Naphthalin usw. in einem offenen zylindrischen Stahltiegel von etwa 15 ml Inhalt gut vermischt. Der Tiegel wurde in eine Porzellanschale gestellt, die soviel kaltes Wasser enthielt, daß es fast bis zum Rande des Tiegels reichte. Auf den Tiegel wurde ein Eisendeckel mit Griff und Bohrung nur lose aufgelegt und dann die Aufschlußmasse durch Einführung eines glühenden Eisendrahtes durch das Loch im Deckel entzündet. Schon einige Monate später verwendet *Pringsheim*[3], hauptsächlich für Flüssigkeiten, die beim Aufschluß im offenen Tiegel meist zu niedrige Werte ergaben, auch einen geschlossenen Tiegel. Der sehr massive Deckel wurde hier aufgeschraubt. Eine Bohrung nahm ein eingekittetes Glasrohr auf, in das ein Kupferdraht mit Öse am unteren Ende eingeschmolzen war. In diese Öse wurde ein Zünddraht eingehängt, der auf dem Tiegelboden auflag. Die Auslösung der Explosion (Zündung) erfolgte elektrisch, die Dichtung zwischen Deckel und Bombe durch einen Kupferblechring. Gleichzeitig weist *Pringsheim* darauf hin, daß die neue Aufschlußmethode auch für die Bestimmung von Phosphor und Arsen in organischen Substanzen benutzt werden könne und

versucht, bei stickstoffhaltigen Substanzen gleichzeitig zu einer Stickstoffbestimmung zu gelangen, indem er den beim Aufschluß in Freiheit gesetzten Stickstoff nach Passage über metallisches Kupfer im Azotometer volumetrisch bestimmt. Er fand dabei, daß zwar die Hauptmenge des Stickstoffs immer als solcher abgespalten, aber auch zu etwa 10% in Alkalinitrat übergeführt wird. Man müßte diese Menge dann für sich durch alkalische Reduktion und Destillation als Ammoniak noch zusätzlich bestimmen. Ich konnte diese Beobachtungen bei der Nachprüfung bestätigen und dabei keinen Zusammenhang zwischen der Bindungsform und der Menge des elementar abgespaltenen Stickstoffs feststellen.

Später greift dann *Parr*[4] die Aufschlußmethode von *Pringsheim* auf. Er gebraucht zum ersten Male die Bezeichnung „Bombe" für seinen Aufschlußtiegel, der recht kompliziert gebaut ist. Die Bombe besteht aus einem Rohrabschnitt, Boden und Deckel mit Stielrohr und oberer und unterer Verschraubung. Die Zündung erfolgt durch Einschleusen eines kleinen Abschnittes eines rotglühenden Eisen- oder Nickelstäbchens. Die Bombe, insbesondere die obere und untere Verschraubung wird bei der Zündung und während des Aufschlusses durch Einstellen in Wasser gekühlt. Deshalb kann er Gummiringe zur Abdichtung von Deckel und Boden gegen das Bombenrohr verwenden. Als Material für die Bombe benutzt er Stahl: 30%iger Nickelstahl erwies sich als nicht wesentlich vorteilhafter. Für die Bestimmung von Schwefel und Arsen in Erzen, Kohlen, Aschen, Koks und Gummi verwendet er als Aufschlußmittel eine Chloratmischung, bestehend aus 10 Teilen Natriumperoxyd und je 0,5 Teilen Kaliumchlorat und Benzoesäure. Zur Bestimmung der Halogene ersetzt er das Kaliumchlorat in dieser Mischung durch ein Gemisch von 5 Teilen Borsäure, 4 Teilen Kaliumnitrat und 1 Teil Magnesiumpulver. Schon *Pringsheim* hatte darauf hingewiesen, daß man zu lebhafte Reaktion durch Zusatz von trockener Soda bremsen, zu schwache durch Beigabe von Substanzen mit viel Kohlenstoff und Wasserstoff lebhafter machen kann. Sowohl *Pringsheim* wie *Parr* verlangen innigste Vermischung von Substanz und Aufschlußreagentien in der verschlossenen Bombe, sogar auch bei Flüssigkeiten.

Auch *Lemp* und *Broderson*[5] arbeiten noch mit Makroeinwaagen und betonen ebenfalls, daß die erste wichtigste Voraussetzung dieser Methode die gründlichste Mischung der Bombenbeschickung sei. Ohne diese sei die Verbrennung unvollständig und die Bestimmung fehlgegangen. Sie ziehen Zucker der Benzoesäure vor und verwenden wesentlich mehr Kaliumnitrat als *Pringsheim* und *Parr* (1 bis 1,5 g gegen 0,5 g auf 10 g Natriumperoxyd). Die Zündung erfolgt einfach durch Erhitzung des Bombenbodens von außen in der heißesten Zone eines Bunsenbrenners solange, bis der Bombenbecher auf ein Viertel seiner Länge rotglühend ist.

Elek und *Hill*[6] gingen als erste zu Mikroeinwaagen über. Sie benutzten dafür zunächst die Makrobomben, aber mit schlechtem Erfolg, weil die in diesem Falle kleinere Reaktionswärme zu rasch durch die Bombe abgeführt und dadurch kein vollständiger Aufschluß erzielt wurde. Sie konstruierten deshalb zunächst eine Mikrobombe aus bestem Stahl, als zweckmäßige Neuerung mit gewölbtem Boden. Später plattierten sie die Bomben innen mit Platin oder stellten sie aus Illium* her. Ihr Inhalt betrug zirka 2,75 ml. Die Aufschlußmischung für 5 mg Substanz bestand aus 1,5 g Natriumperoxyd, 22 mg Kaliumnitrat und 8 mg Rohrzucker. Auch sie schreiben gründ-

* 60 Ni, 21 Cr, 6 Cu, 5 Mo, 2 W, 1 Mn, 1 Si, 1 Al, 1 Fe, Spuren C, B und Ti.

lichstes Mischen der Beschickung in der verschlossenen Bombe als unerläßliche Voraussetzung für gute Verbrennung und richtige Analysenwerte vor. Die Zündung erfolgt ebenfalls in der heißesten Zone eines guten Bunsenbrenners.

Beamish[7] verwendet zum ersten Male Reinnickel zur Herstellung der Bomben wegen der wesentlich besseren Haltbarkeit gegenüber Stahl. Seine Aufschlußmischung bestand nur aus Natriumperoxyd und Milchzucker (1,5 g zu 30 bis 40 mg) für zirka 5 mg Substanz. Vor der Zündung (30 Sekunden in einer kleinen Flamme) wird durch heftiges Schütteln der verschlossenen Bombe für sehr gute Durchmischung der Reaktionsmasse gesorgt.

Trotzdem diese Methodik nun schon 47 Jahre als Makro- und auch bereits 17 Jahre als Mikroverfahren bekannt ist, erschien es mir notwendig, einmal ihre Grundlagen zu untersuchen, um vielleicht dadurch bei gleicher Genauigkeit zu einer weiteren Vereinfachung und noch rascheren Durchführbarkeit der Methode zu gelangen. Zunächst wurde versucht, mit Mikroeinwaagen die Reaktion in zugeschmolzenen Glasröhrchen aus schwer schmelzbarem Glas durchzuführen. Dies gelang jedoch nicht, da die im Augenblick der Zündung freiwerdende Reaktionswärme so groß ist, daß auch verhältnismäßig starkwandige Glasröhren unter starkem Knall glatt durchschmolzen werden, wobei das Glas mit in Reaktion tritt*. Die Reaktion selbst verläuft zwar außerordentlich heftig und unter sehr starker Wärmeentwicklung, jedoch entsteht dabei kaum nennenswerter Druck. Man kann also eigentlich nicht von einer Explosion sprechen. Diese Feststellung erscheint wichtig, weil in der Literatur der Aufschluß meist als Natriumperoxyd- oder Zucker-Natriumperoxyd-Explosion bezeichnet wird.

Nunmehr wurde die Reaktion in oben offenen, unten kugelig geschlossenen Nickelröhren von 1 mm Wandstärke, 14 mm lichter Weite und 50 mm Höhe durchgeführt und beobachtet. Aus den dabei beobachteten Tatsachen konnte ein neues einfaches Aufschlußverfahren entwickelt werden, das sich unter Benützung einer Universalbombe bei praktisch gleicher Arbeitsweise sowohl für Mikro-, Halbmikro- und Makroeinwaagen eignet[8].

Ich fand zusammengefaßt folgendes: Statt durch Erwärmen des Tiegelbodens mit der Flamme kann man die Reaktion auch durch vorsichtiges Zutropfenlassen von wenig Wasser auslösen, wobei heißes Wasser stärker wirkt als kaltes. Meist tritt dabei Entzündung, aber keine Explosion ein. Mischungen von Analysensubstanz mit Kaliumnitrat, organischen Hilfssubstanzen und Natriumperoxyd reagieren dabei, wie zu erwarten war, heftiger als dieselbe Analysensubstanz nur mit Natriumperoxyd gemischt. Der oxydative Aufschluß mit Natriumperoxyd wird also durch Wasser katalysiert. Da Wasser bei der Oxydation des in den Analysensubstanzen enthaltenen Wasserstoffs entsteht, liegt Autokatalyse vor. Dies erklärt auch, warum die bisherigen Autoren alle – aus ihrer empirischen Erfahrung heraus

* Schon *Parr* hat darauf hingewiesen, daß die in der Aufschlußmasse, allerdings bei Makroeinwaagen, auftretende Hitze so groß ist, daß Draht aus Weicheisen zu einer Kugel zusammenschmilzt.

— bei sehr wasserstoffarmen (und natürlich — wegen Mangels an zu oxydierender Materie — auch bei kohlenstoffarmen) Substanzen noch organische Hilfssubstanzen zusetzten, die neben Kohlenstoff möglichst viel Wasserstoff oder Wasser enthalten, und damit gute Wirkung erzielten. Es sei nur daran erinnert, daß zuletzt allgemein für diesen Zweck der Rohrzucker und der Milchzucker dem Naphthalin, der Benzoesäure und der Zimtsäure vorgezogen wurden. Ich selbst fand, daß an Stelle der beiden eben genannten Zucker mit demselben guten Effekt auch andere Kohlenhydrate [formell: $C_x.(H_2O)_y$] oder ihnen in der Bruttozusammensetzung nahekommende Verbindungen, wie z. B. Rübenzucker, Stärken, Cellulose und Cellulosederivate, Mannit, Sorbit, Traubenzucker, Polyvinylalkohol, Pentaerythrit, Paraformaldehyd, Pektine usw. in gleicher Weise geeignet sind. Dann mußten aber — genügend Kohlenstoff in der Analyseneinwaage vorausgesetzt — auch Wasser und stark kristallwasserhaltige anorganische Verbindungen, wie z. B. $Na_2SO_4.10\,H_2O$, $Al(NO_3)_3.9\,H_2O$, $BaO_2.8\,H_2O$, $Na_2B_4O_7.10\,H_2O$, $Na_2CO_3.10\,H_2O$, mit Wasser beladenes Kieselgel usw., ebenso an Stelle der obigen organischen Substanzen verwendet werden können. Diese Voraussetzung hat sich bei meinen Versuchen — wenigstens bei pulverförmigen Substanzen — als durchaus erfüllt erwiesen. Wasser wurde dabei natürlich in einer Kapillare aus Phosphatglas eingeschmolzen eingesetzt. Mischungen aus Natriumperoxyd, organischer Substanz und Kaliumnitrat reagieren rascher, d. h. schon bei wesentlich niedrigerer Temperatur, als die organische Substanz nur mit Natriumperoxyd oder Natriumperoxyd-Kaliumnitrat-Gemisch überschichtet. Der reaktionsfördernde Einfluß des Kaliumnitrats ist dabei ganz beträchtlich, natürlich nur insoweit, als es sich um Mischungen handelt. Dagegen spielt die Menge der organischen Substanz keine so bedeutende Rolle, wie ich ursprünglich anzunehmen geneigt war. Der auch bei 125 mg gesamt-organischer Substanz noch sehr große Überschuß an Natriumperoxyd (20fach) dürfte die Erklärung dafür sein. So zündet — unter sonst gleichen Bedingungen — *ein Gemisch* von 25 mg Analysensubstanz mit 2,5 g Natriumperoxyd erst bei 135° C, bei Zugabe von 100 mg Zucker bei 130° C, bei Zugabe von 500 mg Kaliumnitrat bei 67° C, bei Zugabe von 100 mg Zucker *und* 500 mg Kaliumnitrat bei 63° C, während 25 mg Substanz mit 2,5 g Natriumperoxyd *überschichtet* erst bei 158° C und bei Verwendung eines Gemisches von 2,5 g Natriumperoxyd und 500 mg Kaliumnitrat bei 157° C zünden.

Soweit bei der Zündung der Inhalt des Tiegels nicht herausgeschleudert wurde, war auch bei den Überschichtungsversuchen eine schöne Schmelzung eingetreten. Dies brachte mich auf die Idee, daß es entgegen allen bisherigen Erfahrungen eventuell möglich sein müßte, auf die umständliche Mischung zu verzichten und nur mit Überschichtung zu arbeiten. Voraussetzung dafür war, Substanzen zu finden, die, mit Natriumperoxyd nur überschichtet, bei ähnlich tiefen Temperaturen zünden, wie ich sie für die bis jetzt üblichen Oxydationsmischungen (Analysensubstanz, Natriumperoxyd, Zucker und Kaliumnitrat) festgestellt habe (zirka 65° C). Die dabei auftretende Reaktion müßte weiter so stark sein, daß sie die darüber befindliche Analysensubstanz mit Sicherheit mitreißt, und schließlich müßten diese Substanzen billig und in genügender Reinheit, vor allem chlor- und schwefelfrei herzu-

stellen sein. Mein ganz besonderes Interesse galt dabei den wasserähnlichen Glykolen, dem Glycerin usw. Die Versuchsergebnisse zeigt nachstehende Tabelle:

Tabelle.

ca. 25 mg Substanz überschichtet mit ca. 2,5 g Na_2O_2	Zündung bei ° C	ca. 25 mg Substanz überschichtet mit ca. 2,5 g Na_2O_2	Zündung bei ° C
Rohrzucker	180	p-Nitranilin	106
Vaselinöl	200	Phenol	55
Pentaerythrit	180	Ricinusöl	55
Naphthalin	210	Cyclohexanon	45
Benzoesäure	240 noch nicht	Äthylenglykolmonopropyläther	40
Zimtsäure	200	1,2-Butylenglykol	59
Sorbit	230 noch nicht	Resorcin	58
Monoäthylenglykol	58	Pyrogallol	55
Diäthylenglykol	80	Cetylalkohol	100
Triäthylenglykol	75	Thiodiglykol	78
Tetraäthylenglykol	65	Oleylalkohol	105
Hexaäthylenglykol	70	Dibenzyl-triäthylenglykoläther	150
Polyäthylenglykol 60	100	Natriumacetat. $3H_2O$	240 noch nicht
Polyäthylenglykol 100	150	Schwefel	110
Glycerin	68	Kalium metallisch	210 noch nicht
Natriumacetat	240 noch nicht	Magnesiumpulver	210 noch nicht
1,2-Propylenglykol	56	Roter Phosphor	230 noch nicht
Paraformaldehyd	78	Aluminiumpulver	260 noch nicht
1,4-Butandiol	62	Eisenpulver	210 noch nicht
1,2,4-Butantriol	115	Dioxan	—
Na-Methylat	150 noch nicht	Methanol	—
Oxalsäure. $2\,H_2O$	170 noch nicht		
Tetrahydrofuran	—		
2,3-Butylenglykol	58		
Benzol	—		
Diäthylenglykolmonoäthyläther	55		

Die Werte der Tabelle wurden in folgender Weise erhalten: In einen Nickelblock wurden zwei röhrenförmige Vertiefungen in Form und Ausmaß der oben erwähnten Fingertiegel nahe beieinander gebohrt. Die eine Bohrung nahm das Thermometer, die andere die Beschickung auf. Die Beheizung erfolgte durch eine unter den Block gestellte Gasflamme. Ich verlangte von den Temperaturmessungen keine größere Genauigkeit, als ich sie für meine weiteren Absichten benötigte. Trotzdem sind die niedrigen Zündpunkte fast auf ein Grad, die höherliegenden innerhalb einiger Grade reproduzierbar. Die Reaktion bei der Zündtemperatur ist außerordentlich verschieden und wechselt zwischen ruhigem Abbrennen und starker Stichflamme, gelegentlich auch mit leichtem Knall. Aromaten geben in der Regel starke Rußabscheidung, doch tritt dies auch bei Aliphaten auf. Eisen-, Magnesium- und Aluminiumpulver einerseits, roter Phosphor und metallisches Kalium anderseits waren tatsächlich nicht angegriffen worden, denn beim Zufügen von Wasser unmittelbar nach dem Versuch erfolgte glatt Zündung. Bei den in der Zündungsspalte mit einem Strich versehenen Substanzen, z. B. Methanol, Dioxan und

Tetrahydrofuran, destillierten diese Lösungsmittel unverändert aus dem Tiegel heraus, bevor sie zur Zündung kommen konnten, und brannten oben einfach ab. Die untersuchten Substanzen waren nicht besonders getrocknet. Das Äthylenglykol enthielt z. B. 0,17%, das Tetraäthylenglykol 1,44%, der Diäthylenglykolmonoäthyläther 4,3% Wasser. Für das Äthylenglykol habe ich noch die Zündungsgrenzen im Gemisch mit Wasser bei Zimmertemperatur (27° C) bestimmt. Sie liegen zwischen Wassergehalten von 7,3% und 80%. Bis zu 7,3% Wasser zündet ein solches Gemisch nicht spontan. Von 7,3% bis zirka 55% Wasser erfolgt heftige Reaktion mit Knall und Feuererscheinung, zwischen 55% und zirka 69% erfolgt nur noch heftige Reaktion mit Knall. Von 69% bis 80% Wassergehalt erfolgt immerhin noch wesentlich heftigere Reaktion, als zwischen Wasser und Natriumperoxyd allein.

Die von mir untersuchte Reaktion zwischen Natriumperoxyd und organischen Substanzen, die ich nur soweit durchführte, als sie für meine Zwecke erforderlich war, scheint ähnliche Rückschlüsse auf die Konstitution der organischen Verbindungen zuzulassen wie die von *Rathsburg* und *Gawlick*[9] untersuchte Reaktion mit Kaliumpermanganat. Ich möchte annehmen, daß beide Reaktionen bei der Untersuchung unbekannter organischer Verbindungen als qualitative Vorprobe gute Dienste leisten können. Zur quantitativen Halogenbestimmung (im zugeschmolzenen Glasröhrchen) hat schon *Sanchez*[10] das Kaliumpermanganat im Gemisch mit Bimssteinpulver vorgeschlagen.

Die bisherigen Versuche hatten mir gezeigt, daß es eine größere Anzahl organischer Verbindungen gibt, die bei gewöhnlicher Temperatur noch nicht, aber schon bei niedrigeren Temperaturen mit Natriumperoxyd reagieren (zünden), als das bisher übliche Gemisch aus Analysensubstanz, Zucker, Kaliumnitrat und Natriumperoxyd. Diese Feststellung legte mir den Gedanken nahe, auf die Verwendung von Zucker und Kaliumnitrat und den die Analyse zeitlich belastenden Mischungsvorgang zu verzichten und für den Aufschluß mit Natriumperoxyd in der Bombe ein neues Prinzip zu verwenden. Dieses neue Prinzip besteht darin, daß in die Bombe zuerst eine als Zündstoff wirkende organische Hilfssubstanz, darauf die Analysensubstanz und dann Natriumperoxyd gegeben und auf jede Durchmischung verzichtet wird. Für mein neues Prinzip schien mir eine Flüssigkeit wegen der besseren Wärmeübertragung, der besseren Berührungsmöglichkeit mit dem Natriumperoxyd und der leichten Dosierbarkeit am besten geeignet, obwohl im Prinzip jede organische Substanz mit genügend niedrigem Zündungspunkt und ohne viel Kohlenstoffabscheidung in Berührung mit Natriumperoxyd geeignet ist. Es liegt auf der Hand, daß ich aus den von mir untersuchten Verbindungen das Äthylenglykol auswählte. Es ist ein billiges Handelsprodukt, kann durch Destillation unter gewöhnlichem Druck leicht rein dargestellt werden und enthält nur Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff, Elemente also, die die weitere analytische Behandlung des aufgeschlossenen Reaktions-

gemisches in keiner Weise stören. Die geringe Wasseraufnahme beim Gebrauch durch Hygroskopizität ist ohne Belang. Schon die ersten Versuche zeigten die Überlegenheit des neuen Verfahrens. Seine Vorteile gegenüber den bisherigen Verfahren ergeben sich aus folgendem:

Wenn auch die Zündpunkte der bisher benützten Oxydationsmischung aus Analysensubstanz, Natriumperoxyd, Kaliumnitrat und Zucker, im offenen Tiegel ermittelt, nur um etwa 5° C höher liegen als die der neuen Äthylenglykolzündung, so bedingt dieser kleine Unterschied doch, wie ich experimentell feststellte, folgende wichtige Tatsache:

Beschicken wir die bisherige Mikro- und Halbmikrobombe mit dem üblichen Aufschlußgemisch, dann findet die Zündung der Reaktionsmasse frühestens nach 120, meist erst nach 210, gelegentlich aber auch erst nach 240 bis 300 Sekunden statt. Beschicken wir die neue Universalbombe dagegen mit der gleichen Einwaage und der gleichen Menge Natriumperoxyd ohne Kaliumnitrat und Zucker und ungemischt, dafür aber mit Äthylenglykol als Zündstoff, so findet die Zündung bei völlig gleicher Erhitzung bereits nach 10, längstens aber nach 30 Sekunden statt. Die von der Bombe bis zur Zündung aufgenommene Wärmemenge ist also im zweiten Falle 4- bis 30-, im Mittel sicher 10mal kleiner als bisher. Der praktisch momentan verlaufende Zünd- und Oxydations- (Aufschluß-) Vorgang findet also bei dieser neuen Arbeitsweise auf einem wesentlich niedrigeren Wärmeniveau statt. Dadurch werden aber die Heftigkeit der Reaktion, der entstehende Druck und die Korrosion der Bomben in entsprechender Weise vermindert, die Schnelligkeit, Sicherheit und Gefahrlosigkeit des Aufschlusses dagegen gesteigert.

Im Gegensatz zu der bisher allgemein vertretenen Ansicht, daß Oxydationsmittel und Analysensubstanz innigst gemischt werden müssen, verzichtet mein Verfahren bewußt auf die Mischung. Ich habe mich in sehr vielen Versuchen davon überzeugt, daß immer gute Durchzündung eintrat, auch bei in Näpfchen oder Ampullen eingewogenen Substanzen. Ja, man konnte feste Analysensubstanzen sogar zu Tabletten gepreßt einsetzen. Das empfiehlt sich z. B. bei sehr voluminösen Pulvern.

Das zur Herstellung der Näpfchen und Ampullen verwendete kieselsäurefreie Phosphatglas (aber auch anderes Glas) reagiert bei der Aufschlußtemperatur vollständig mit dem Natriumperoxyd und begünstigt auf diese Weise sogar den Aufschluß. Beim Aufschluß rein anorganischer Substanzen empfiehlt sich daher ein Zusatz von geeignetem Glaspulver oder auch von Borax und der doppelten Menge Äthylenglykol.

Als Dichtung verwende ich nicht mehr Metallringe (Kupfer, Blei, Aluminium), sondern Gummiringe, die sich, besonders in der Mischung 100 Perbunan, 50 hochaktiver Ruß, übliche Vulkanisationsbeschleuniger, wesentlich besser bewährt haben, billig sind und 20 bis 30 Aufschlüsse gut aushalten.

Als Material für die Herstellung der Bomben dient ein Reinnickel, aber mit einem Gehalt von 0,3% Mangan*. Dieses Material ist so widerstandsfähig, daß ich damit eine Bombe konstruieren konnte, die den 2,85fachen Inhalt unserer bisherigen Mikro- und Halbmikrobombe bei fast demselben Gewicht (28 gegen 30 g) besitzt. Die leichte Verschraubung wiegt 99 g, die komplette Universalbombe mit Verschraubung, Deckel und Dichtung also nur 155 g, gegenüber 678 g bei der bisherigen Makro- und 548 g bei der bisherigen Mikro- und Halbmikroausführung. Trotzdem ist sie sowohl für Mikro-, als auch für Halbmikro- und auch für Makroeinwaagen bis zu max. 0,5 g Substanz geeignet. Die neue Universalbombe besitzt überall, auch an der Auflagefläche für den Deckel, mit Ausnahme des in der Mitte — auslaufend nach den Seiten — auf 2 mm verstärkten Bodens, eine Wandstärke von 1 mm. Der Deckel ist ebenfalls nur 1 mm stark und besitzt einen mit einem Loch versehenen Griff zum bequemen Hantieren. Der 2 mm in

Abb. 1. Lichtbild der Universalbombe.

den Bodenraum hineinragende Absatz des Deckels hat gegen die Bombenwandung 0,10 mm Spielraum, um mit Sicherheit sein Festklemmen zu vermeiden. Der Absatz ist am Deckelrand 2 mm hinterdreht**, damit der Abdichtungsgummiring von 3,3 mm Stärke festgehalten wird. Hochdruckrillen usw. an Bombe und Deckel sind nicht mehr erforderlich.

Die neue Methodik ist schnell, elegant, einfach und absolut sicher. Die Universalbombe† aus manganhaltigem Nickel und die Verschraubung aus Stahl — zweckmäßig aus nicht rostendem Material — sind äußerst einfach konstruiert und deshalb billig in der Herstellung. Das Verschließen und das Öffnen der Bomben geschieht nur von Hand ohne Anwendung von mechanischer Gewalt. Trotzdem habe ich in Hunderten von Bestimmungen noch niemals ein Undichtwerden und Ausblasen (verlorene Analyse) der Universalbombe zwischen Bombe und Deckel beobachtet, während dies bei der bisherigen Mikro- und Halbmikrobombe in ungefähr 3% aller Analysen auftritt. Sollte einmal, z. B. bei

* Unter der Bezeichnung Reinnickel 99,2 bis 99,4% zu beziehen von den vereinigten Nickelwerken A. G., Schwerte/Ruhr.

** Nach neueren Versuchen nicht erforderlich.

† Zu beziehen durch die Firma *K. G. Janke* u. *Kunkel*, Staufen im Breisgau. (Bombenbecher durchgehend 1,5 mm stark.)

Chlorhydraten oder sauren Substanzen ein Ausblasen eintreten, so ist dies völlig gefahrlos, weil lediglich der Überdruck zwischen Deckelauflagefläche und Gummidichtung entweicht. Man füllt die Bombe dann eben mit Natriumperoxyd voll und geht bei Makroeinwaagen etwas in der Einwaage zurück. Weitere Maßnahmen sind: Starkes Abbrechen im Glykolzusatz und Verwendung einer Mischung von wasserfreier Soda mit Natriumperoxyd an Stelle von reinem Natriumperoxyd.

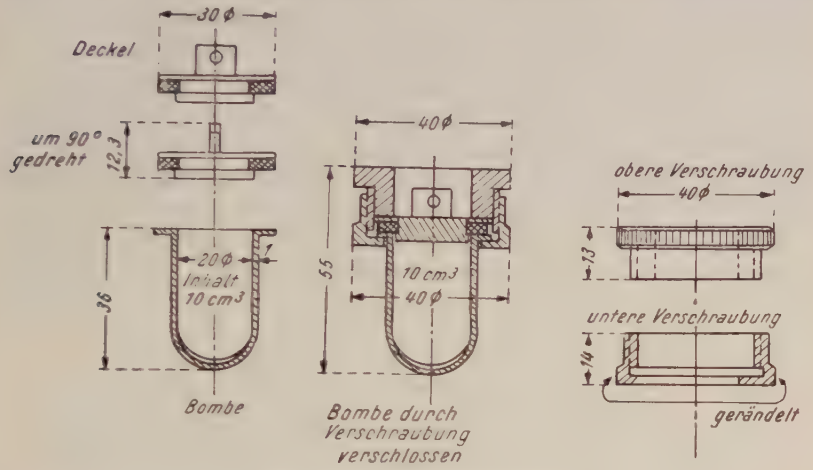


Abb. 2. Skizze der Universalbombe.

Die komplizierten und schweren Halterungen und Verschraubungen der bisherigen Bombenmodelle, die Dichtungsrillen am Bomben- und Deckelrand, der Metallblock für die Makrobombe, der Aluminiumhaltering für die Mikrobombe, der Sechskant- und der Steckschlüssel, die Oxydationsmischungen, die Maßlöffel und das Mischgefäß für diese sind nicht mehr erforderlich. Die Aufschlußzeit ist von 20 Min. bei der Makrobombe und 7 Min. bei der Mikro- und Halbmikrobombe auf 1 Min. verkürzt. Dadurch ist es z. B. möglich, eine Halogenbestimmung in einer organischen Substanz mit Mikro-, Halbmikro- oder Makroeinwaage in ein und derselben Bombe nach der gleichen Arbeitsweise einschließlich Einwaage und Berechnung des Resultates in 17 Min. durchzuführen. Selbstverständlich kann man in dem in geeigneter Weise herausgelösten Aufschlußgemisch auch andere Elemente als Halogene bestimmen, z. B. Schwefel, Phosphor, Silizium, Arsen, Bor, Metalle usw. Da der Aufschluß in 1 Min. zur Verfügung steht, wende ich ihn auch für rein qualitative Prüfungen an*. Über die weitere Behandlung der Aufschlüsse s. *Wurzschmitt* und *Zimmermann* (l. c.).

* Vergleiche *Högl*[11], Nachweis von N, P, S u. Halogenen mit Na_2O_2.

Zur Ausführung eines Aufschlusses gibt man in die leere *trockene* Universalbombe — die Bombe steht dabei lose in der Verschraubung als Haltevorrichtung, untere Verschraubung mit Unterseite nach oben auf obere Verschraubung gelegt — 8 Tropfen reines Äthylenglykol. Dieses befindet sich zweckmäßig in einem kleinen Fläschchen mit durch einen Gummistopfen eingeführtem Tropfröhrchen mit Sauger. Die Pipettenspitze ist so zu wählen, daß 8 Tropfen etwa 160 bis 170 mg Glykol entsprechen. Dazu gibt man die abgewogene Analysensubstanz, wenn es sich um pulverförmige bzw. feste Substanzen oder um in Ampullen eingeschmolzene Flüssigkeiten handelt. Pastenförmige bzw. für die Einfüllung in Ampullen zu zähe Proben werden in Näpfchen eingewogen. Handelt es sich um wäßrige Pasten, werden sie in Näpfchen leicht mit wasserfreier Soda abgedeckt. Vor der Einführung der gefüllten Näpfchen in die mit Glykol beschickte Bombe wird in diese soviel Natriumperoxyd gegeben, daß das Glykol gerade abgedeckt ist. Es ist nicht erforderlich, daß das Näpfchen aufrecht steht. Dagegen soll es die Bombenwand nicht berühren. Nunmehr wird in allen Fällen mit Natriumperoxyd überschichtet, wobei man zunächst erst einmal wenig zugibt, um sich zu überzeugen, daß dabei noch keine Reaktion eintritt. Ich verwende für Mikro- und Halbmikroeinwaagen 3 bis 4 g Natriumperoxyd*. Bei Makroeinwaagen wird die Bombe bei leichtem Aufstoßen bis 2 mm unterhalb des oberen Randes gefüllt (= zirka 11 g). Sehr voluminöse Substanzen werden dabei zweckmäßig zu Pastillen gepreßt verwendet. Sollte es ganz gelegentlich — mir ist es noch nicht passiert — einmal vorkommen, daß beim Zugeben der ersten Anteile Natriumperoxyd bereits eine Reaktion eintritt, so deckt man Glykol und Analysensubstanz leicht mit Soda ab und überschichtet erst dann mit Natriumperoxyd. Bei sehr leicht flüchtigen Flüssigkeiten, wie z. B. Chloräthyl, Vinylchlorid, Schwefelkohlenstoff usw., verwendet man 5 bis 6 g Natriumperoxyd, statt 3 bis 4 g. Nach der Füllung wird der Deckel mit Gummidichtung aufgesetzt, die Bombe in die untere Verschraubung eingeführt und die obere Verschraubung zugedreht. Sicherer Verschluß wird schon durch den an beiden geränderten Verschraubungsteilen angreifenden Druck der Hände erzielt. Nun wird die verschlossene Bombe in das Loch der Platte des Schutzofens gestellt oder gehängt. Die Flammenspitze des Mikrobrenners darf dabei nur gerade den Bombenboden berühren. Die Durchzündung erfolgt bereits nach 10 bis 20 Sekunden. Nach weiteren 40 bis 50 Sekunden wird die Bombe aus dem Ofen genommen, in dest. Wasser abgekühlt und geöffnet. Wenn das Aufschlußgemisch noch unverbrannten Kohlenstoff enthält, stört dies die weitere Aufarbeitung nicht. Es ist bei der Halogen*titration*

* Bei Mikroeinwaagen kann man auf 1,5 bis 2 g heruntergehen.

nicht einmal nötig, davon abzufiltrieren. Bei weiterer Behandlung der Aufschlußlösung auf dem Fällungswege empfiehlt sich dagegen vorherige Filtration. Durch Verwendung einer größeren Menge Natriumperoxyd kann überdies die Kohlebildung praktisch vermieden werden. Auch das Öffnen der Bombe geschieht zwanglos von Hand. Die Weiteraufarbeitung des aufgeschlossenen Reaktionsgemisches geschieht nach bekannten Methoden.

Obwohl ich noch nie ein Aufreißen der Bombe beobachtet habe, empfehle ich doch, von der Zugabe des Natriumperoxyds an bis zum Öffnen der Bombe Brille oder Schutzbrille zu tragen und zum Zünden der Bombe den Schutzofen zu benützen.

Von der Wiedergabe von Versuchsergebnissen sehe ich bewußt ab. Es wurden schon Hunderte von Chlor-, Brom- und Jodbestimmungen, darunter auch in hoch halogenhaltigen und leicht flüchtigen Substanzen, wie z. B. Chlormethyl und Chloräthyl, Tetrachlorkohlenstoff, Polyvinylchloride, Hexachloräthan, Schwefelbestimmungen (auch Schwefelkohlenstoff) und Siliciumbestimmungen in Siliconen usw. mit größter Genauigkeit durchgeführt.

Ich habe diese Arbeit anfangs Februar 1950 begonnen. Daß ihr Ergebnis jetzt schon den Fachgenossen bekanntgemacht werden kann, verdanke ich der überaus fleißigen und zuverlässigen Mitarbeit der Herren *L. Schlindwein*, *R. Beckmann* und *W. Jöst*, die einen großen Teil der experimentellen Durchprüfung neben ihrer laufenden analytischen Tätigkeit übernahmen. Ich danke ihnen sowie Herrn *G. Gräter* von unserer mechanischen Werkstätte für die schnelle und exakte Bereitstellung der Versuchsmodelle, auch an dieser Stelle nochmals herzlich.

Zusammenfassung.

1. Die bis jetzt gebräuchliche Form des oxydativen Aufschlusses mittels Natriumperoxyds in der Metallbombe verlangte verschiedene Bombenausführung für Mikro-, Halbmikro- und Makroeinwaagen. Die Bomben und ihre Halterungen waren sehr schwer und ihre Herstellung war wegen der vielen an ihnen angebrachten Schikanen sehr teuer. Es wurde deshalb eine leichte, einfache und billig herzustellende Universalbombe konstruiert, die für alle Einwaagen (Mikro- bis Makro-) verwendet werden kann.

2. Die bisher für den Aufschluß verwendete Mischung aus Analysensubstanz, Kaliumnitrat, Zucker und Natriumperoxyd, bei der in etwa 3% zu brisante Aufschlüsse (verlorene Analysen) auftreten, wurde verlassen und ein neues Zündverfahren eingeführt: Ohne Mischung werden Äthylenglykol, Analysensubstanz und Natriumperoxyd in die Bombe eingefüllt. Äthylenglykol und Natriumperoxyd (Zündsatz) zünden bereits bei zirka 56° C, also noch bei relativ kalter Bombe und reißen die

Analysensubstanz mit. Dadurch wird die Verbrennung in ihrer Heftigkeit gemildert, erheblich Zeit gewonnen und das Bombenmaterial geschont.

Summary.

1. The mixture hitherto employed for the disintegration consisting of the substance to be analysed, potassium nitrate, sugar and sodium peroxide was replaced by a new method of fusing: The bomb is filled, without mixing, with ethylene glycol, substance to be analysed and sodium peroxide. Ethylene glycol is fused, in the presence of sodium peroxide, already at about 56° C i. e. when the bomb is still relatively cold, and goes into contact with the substance. The rapidity of combustion is thus slackened, time is gained, and the material of the bomb is spared.

2. A light and simple universal bomb was constructed, which can cheaply be built and may be used for all amounts of starting substance (micro, semi-micro and macro).

Résumé.

1° Le procédé appliqué jusqu'ici pour la désagrégation oxydative dans la bombe métallique au moyen de peroxyde de sodium exigeait différents types de bombes suivant qu'il s'agissait de pesées micro, semi-micro ou macro. Les bombes et leurs dispositifs de vissage étaient très lourdes et leur fabrication, par suite de leurs nombreuses particularités, revenait fort cher. On a construit pour cette raison une bombe universelle, simple et bon marché, convenant pour toutes les pesées (micro à macro).

2° Le mélange employé pour la désagrégation, composé de la substance à analyser, de nitrate de sodium, de sucre et de peroxyde de sodium avec lequel dans environ 3% des cas il se produit une désagrégation trop brisante (analyse perdue) a été abandonnée et un nouveau procédé d'allumage a été élaboré: on introduit dans la bombe du glycol d'éthylène, la substance à analyser et le peroxyde de sodium sans les mélanger. Le glycol d'éthylène et le peroxyde de sodium (charge d'allumage) s'allument déjà à 56°C, c'est-à-dire lorsque la bombe est relativement froide et provoque aussi l'allumage de la substance à analyser. De la sorte la combustion est moins violente, on gagne notablement de temps et le matériel de la bombe est ménagé.

Literatur.

[1] *B. Wurzschmitt* und *W. Zimmermann*, Fortschr. chem. Forsch. **1**, 485 (1950).

[2] *H. H. Pringsheim*, Ber. dtsch. chem. Ges. **36**, 4244 (1903).

[3] *H. H. Pringsheim*, Amer. Chem. J. **31**, 386 (1904).

[4] *S. W. Parr*, J. Amer. Chem. Soc. **30**, 764 (1908).

[5] *J. F. Lemp* and *H. J. Broderson*, J. Amer. Chem. Soc. **39**, 2069 (1917).

[6] *A. Elek* and *D. W. Hill*, J. Amer. Chem. Soc. **55**, 2550, 3479 (1933).

[7] *F. E. Beamish*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **5**, 348 (1933) und ebenda **6**, 352, 379 (1934).

[8] *B. Wurzschmitt*, Chem.-Ztg. **74**, 356—360 (1950).

[9] *H. Rathsburg* und *H. Gawlick*, Chem.-Ztg. **65**, 426 (1941).

[10] *J. A. Sanchez*, J. pharm. chim. **130**, 5 (1937).

[11] *O. Högl*, Trav. chim. alimentaire et hygiène. Eidgen. Gesundheitsamt Bern.

Laboratoire de Microanalyse organique du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.

Microdosage du sélénium dans les composés organiques.

Par

Ernest Kahane et Stéphane Korach.

Avec 1 figure.

(Reçu le 10 novembre 1950.)

Introduction.

La multiplicité des travaux qui sont consacrés au dosage du sélénium montre à elle seule qu'il n'y a pas de solution générale absolument satisfaisante.

En apportant notre contribution à ce problème, nous donnons une revue rapide des travaux parus depuis 1925, en considérant successivement 1° la minéralisation des composés organo-séléniés, 2° la séparation et 3° le dosage du sélénium proprement dit*.

Un très petit nombre parmi ces travaux sont consacrés au microdosage. Encore la plupart concernent-ils le dosage de très faibles quantités de sélénium au sein de grandes quantités de substances organiques ou biologiques: c'est le problème qui se présente en biochimie et en toxicologie. Ce n'est pas celui que nous envisageons dans ce travail; nous nous occupons essentiellement du microdosage du sélénium dans les composés organiques et nous opérons, selon la teneur en sélénium du produit considéré, sur des prises d'essais de 5 à 50 mg.

Le microdosage du sélénium dans les composés organiques reste une opération exceptionnelle et ne mérite pas, selon nous, le long travail qu'exigerait la mise au point d'une méthode volumétrique ou colorimétrique. Nous préférons adopter la méthode gravimétrique la plus classique: pesée du sélénium pur, précipité par action d'un réducteur sur le liquide de minéralisation.

* Revues générales par *O. Blot*[7], *Congdon* et *Bray*[12], *Goffin-Octors*[27], *Hovorka*[30], *Mackay* et *Avons*[40], *Williams* et *Byers*[70].

Nos efforts ont donc porté exclusivement sur l'attaque de la substance organique, et nous avons recherché les conditions dans lesquelles la minéralisation du sélénium est totale, sans qu'il y ait de perte par volatilité. La méthode nitro-perchlorique[32] nous a paru pouvoir rendre les mêmes services pour ce dosage que pour celui de l'arsenic[33], du soufre[34], du phosphore[35], de l'iode[36], du bore[1], etc....

Minéralisation.

Les méthodes habituellement proposées sont par voie sèche ou par voie humide.

Par voie sèche, on a recommandé la calcination en présence de carbonate de sodium[54], de peroxyde de sodium[49, 52], de manganite de potassium[15], ainsi que la combustion dans un courant d'oxygène[3, 41, 61, 64].

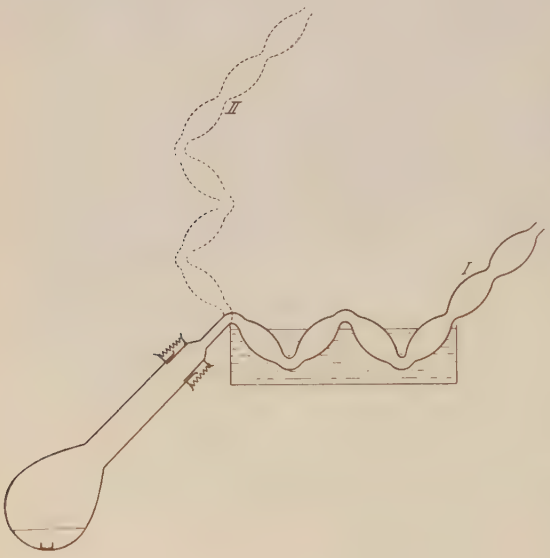


Fig. 1.

Par voie humide, on a recommandé l'acide nitrique en récipient ouvert[49] ou en tube scellé[22]. Comme l'oxydation totale est difficile dans ces conditions, on a adjoint à l'acide nitrique du chlorate de potassium[14, 59], du permanganate de potassium[8], de l'acide sulfurique seul[18, 25, 54, 71] ou avec de l'oxyde de mercure[13], de l'eau oxygénée[25]. L'action de l'acide sulfurique en présence d'oxyde de mercure a également été préconisée[69].

On a aussi recommandé une méthode mixte, comportant une attaque humide par l'eau oxygénée et l'acide nitrique, puis une calcination en présence de nitrate de magnésium[47].

L'emploi de l'acide perchlorique ne semble avoir été préconisé que par un seul auteur, qui l'utilisait associé aux acides sulfurique et nitrique, avec un catalyseur au vanadium[43]. Cette méthode est à recommander en toxicologie à la condition d'observer les précautions qu'impose l'emploi de l'acide perchlorique[37].

Notre expérience de la méthode nitro-perchlorique nous a fait penser que nous pourrions réaliser au moyen de ces réactifs une minéralisation rapide et satisfaisante. Le problème essentiel est d'éviter qu'une partie du sélénium ne soit entraînée avec les composés volatils au cours de l'attaque (cf. *Dolique* et *Pérahia*)[20]. On sait que c'est ce qui se produit pour le dosage du soufre, de l'iode ou du bore. Nous utilisons pour le

dosage de ces éléments la fiole à barbotteur en W de *Ernest* et *Marcelle Kahane* (fig. I), qui permet de récupérer ce qui est entraîné par les vapeurs de l'élément que l'on veut doser. A la fin de l'opération, cet élément se retrouve donc pour une part dans la fiole-laboratoire, pour une part dans le barbotteur. Selon les cas il est chassé du ballon dans le barbotteur (iode[36]), ou il est entraîné du barbotteur dans le ballon-laboratoire (soufre[34] et bore[1]).

Nous avons constaté qu'il en est de même dans l'attaque nitro-perchlorique du sélénium et des composés organo-séléniés: une proportion importante du sélénium est entraînée avec les vapeurs. En opérant sur 12 mg de sélénium, en utilisant 2 à 5 ml de mélange nitro-perchlorique et en garnissant le barbotteur d'eau distillée, nous avons retrouvé en fin d'opération dans ce barbotteur 35 à 70% du sélénium (Tableau I).

Tableau I.

Substance	Se en mg	Se trouvé dans le barbotteur	
		en mg	%
Attaque nitro-sulfo-perchlorique ...	11,90	4,18	35,1
Attaque nitro-perchlorique	11,90	8,32	69,9
id.	11,90	7,84	65,9

Pour réunir les deux portions liquides renfermant le sélénium, il suffit de renverser le barbotteur à la fin de l'opération, *après refroidissement* (position II de la figure). Son contenu s'écoule dans la fiole-laboratoire. Il suffit ensuite de porter le liquide à l'ébullition pour que les vapeurs, en s'élevant et en se condensant dans le barbotteur, produisent un lavage économique et efficace.

Séparation.

Tant dans le but de simplifier le système dans lequel se fera le dosage du sélénium, qu'afin d'isoler cet élément sous une forme chimique définie, différentes méthodes de séparation ont été préconisées.

La distillation a été fréquemment utilisée, notamment par les toxicologues. Elle consiste le plus souvent à porter à l'ébullition le liquide résultant de la destruction, additionné de brome ou d'acide bromhydrique. Dans certains cas, la même opération a été faite au moyen d'acide chlorhydrique concentré[9] ou gazeux[18]. Le sélénium distille à l'état d'halogénure.

La précipitation se fait en général par réduction en milieu acide, les réactifs recommandés étant les suivants: hydrazine et ses sels[25], chlorure mercureux[46], chlorure stanneux[49], acide sulfureux[8, 14, 22, 31, 52, 59, 71], iodure de potassium[52, 61], thiocarbamide[23], hydroxylamine[9]. Avec tous ces réactifs, le sélénium précipite à l'état rouge colloïdal. L'un des points délicats consiste à le transformer en un précipité compact de sélénium noir. Enfin, la précipitation à l'état de séléniate de plomb a été recommandée par *Spacu*[57].

Nous avons adopté une méthode se rapprochant de celle qui est proposée d'une façon classique. Nous additionnons le liquide de réaction d'acide chlorhydrique de façon à atteindre une concentration de 80% en acide $d = 1{,}19$ et nous ajoutons 2—3 g de sulfite de sodium pour 100 ml. Le sélénium précipite à l'état rouge; après 5 minutes de repos, nous décantons sur filtre et nous transformons la variété rouge en variété noire par lavages à l'eau bouillante.

Dosage.

Le dosage gravimétrique repose presque toujours sur la pesée du sélénium.

Le séléniate de plomb a également été préconisé; d'après *Kato*, *Hosimiya* et *Nakazima*[38] il doit être séché au-dessous de 280°.

De nombreuses méthodes volumétriques ont été proposées. Elles reposent:

1° sur la réduction des séléniates par l'acide bromhydrique[65], le trichlorure de titane[63] ou le sulfite de sodium[3, 64];

2° sur l'oxydation des sélénites par le permanganate de potassium en milieu alcalin[50, 58, 62] ou par le bromate de potassium[2];

3° sur la réduction de l'acide sélénieux, notamment par l'iodure de potassium, et le titrage de l'iode libéré d'après la méthode de *Muthmann* et *Schaefer*[4, 41, 47, 53, 54, 56, 65];

4° sur l'oxydation du sélénium précipité, par un bromate ou un iodate en milieu acide[11, 67];

5° sur l'action du thiosulfate sur l'acide sélénieux avec formation de $SeS_4O_6Na_2$ et de tétrathionate. L'excès de thiosulfate est titré à l'iode (méthode de *Norris* et *Fay*[10, 13, 39, 43, 66, 69]). Pour l'examen critique de cette méthode cf. *Coleman* et *McCrosky*[10].

Diverses méthodes potentiométriques ont été préconisées par *Tomicek*[63], *Someya*[55], *De Salas*[17], *Lingane* et *Niedrach*[40].

Enfin de nombreuses méthodes photométriques ont été décrites:

1° néphélométrie de la solution colloïdale de sélénium obtenu par réduction au moyen de la thiourée[16], du chlorure stanneux[51], adsorbé dans certains cas sur du sulfate de baryum[24] ou de l'oxyde de fer[60], ou stabilisé par la gomme arabique[19, 26] ou par le glycérol[21];

2° colorimétrie de l'iode libéré par réduction de l'acide sélénieux (méthode de *Meyer* et *V. Garn*[44]);

3° colorimétrie reposant sur différentes propriétés spécifiques: teinte brune du tétrachlorure de sélénium dans le pyrrol[48], teinte verte du sélénium dans l'acide sulfurique concentré[45], teinte du sélénium dissous dans le sulfure de sodium (*Von Stein*[68]).

Pour les méthodes photométriques voir également *Bertiaux*[5], *Gortner* et *Lewis*[28], *Hirano*[29].

Pour les raisons que nous avons exposées plus haut, nous nous en sommes tenus à la gravimétrie du sélénium que nous recueillons sur un microfiltre de *Pregl* garni d'amiante et taré. Le sélénium lavé successivement à l'acide chlorhydrique, à l'eau froide, à l'eau bouillante et à l'alcool, est séché 10 minutes à 105° et pesé.

Mode opératoire.

Réactifs: NO_3H, d = 1,33
ClO_4H, d = 1,69
ClH, d = 1,19
SO_3Na_2, en solution aqueuse saturée.

Appareils: appareil à barbotteur en W: fioles de 60 ou 125 ml, olives du barbotteur de 15 ml (fig. 1).

Attaque: La prise d'essai (de 5 à 50 mg, soit 3 à 5 mg de sélénium), pesée avec précision dans une petite cupule de verre à fond plat, de 6 mm de diamètre et 10 mm de hauteur environ, est introduite avec la cupule dans le ballon-laboratoire. On ajoute 1,5 ml NO_3H et 2 ml ClO_4H.

Le barbotteur, dont chacun des coudes est garni d'un peu d'eau (3 ml environ au total) est mis en place et maintenu par de petits ressorts fixés sur des ergots, les coudes du W plongeant dans le cristallisoir plein d'eau qui sert à les refroidir (position I de la figure).

Le mélange est alors porté à l'ébullition. L'attaque se produit en général au cours de ce chauffage. Elle aboutit à la dissolution de l'échantillon et donne lieu au dégagement de vapeurs nitreuses. La cupule de verre agit comme régulateur de l'ébullition.

Le chauffage est mené de telle sorte que l'excès d'acide nitrique distille. L'acide perchlorique agit à son tour, avec production de fumées blanches. Pour les fortes prises d'essai, il est prudent d'interrompre le chauffage lorsque l'acide perchlorique commence à agir, car la réaction amorcée se poursuit spontanément.

Enfin le liquide perchlorique est porté à une ébullition assez vive jusqu'à décoloration totale du liquide, qui intervient très rapidement dans la plupart des cas. Durée totale de l'attaque: 10 à 20 minutes.

Après refroidissement du ballon, le barbotteur en W est tourné de 180° dans le rodage (position II de la figure), de manière à faire descendre dans le ballon la totalité des liquides de lavage et de condensation. Le contenu du ballon est porté à l'ébullition: la vapeur d'eau produite monte dans le barbotteur, produisant par condensation et reflux un lavage parfait, sans aucune dilution supplémentaire. L'ébullition est prolongée jusqu'à disparition de toute odeur de chlore perceptible à l'extrémité du barbotteur, disparition qui coïncide généralement avec la sortie des premières bouffées de vapeur d'eau.

Précipitation du sélénium: Le dosage se terminant gravimétriquement, il importe de séparer les traces de matières en suspension et notamment les fragments de verre. Pour cela, le contenu du ballon est filtré quantitativement, sous pression réduite, sur un filtre en verre fritté G 4, avec lavages à l'acide chlorhydrique. Les liquides sont réunis dans un tube en Pyrex de 60 ml.

La précipitation du sélénium devant se faire dans un milieu contenant au moins 70% d'acide chlorhydrique, on porte le volume total de liquide dans le tube à 35 ou 40 ml, par addition d'acide chlorhydrique concentré (toujours à travers le filtre).

Le liquide est ensuite additionné d'un excès suffisant de la solution saturée de sulfite de sodium pour qu'une forte odeur d'anhydride sulfureux soit perceptible, soit 3 à 5 ml.

La solution est agitée vivement avec une baguette de verre. Il se forme un gros précipité de chlorure de sodium, ainsi qu'une suspension colloïdale de sélénium rouge qui se rassemble après 2 à 5 minutes, aidée en cela par les cristaux de chlorure de sodium.

Tableau II.

	Prise d'essai en mg	Se pesé en mg	Se % trouvé	Se % calculé	Erreur %
Sélénium à 99,0%	13,21	13,15	99,5	99,0	+ 0,5
	4,74	4,72	99,6	99,0	+ 0,6
Diphényl sélénium	30,94	10,47	33,8	33,9	— 0,3
	33,37	11,34	33,95	33,9	+ 0,1
	29,22	9,94	34,0	33,9	+ 0,3
	10,58	3,56	33,65	33,9	— 0,7
	10,54	3,53	33,5	33,9	— 1,2
$C_6H_5, CH_2, Se, CH_2, CH_2, CO_2H$	7,97	2,56	32,1	32,5	— 1,2
	7,33	2,37	32,3	32,5	— 0,6
	10,87	3,57	32,8	32,5	+ 0,9
$C_6H_5, CH(CO_2H), Se, CH(CO_2H), C_6H_5$	13,13	2,93	22,3	22,6	- 1,3
	14,67	3,29	22,5	22,6	— 0,4
	17,07	3,84	22,5	22,6	— 0,4
$(Se, CH_2, CO_2H)\ 2$	4,94	2,84	57,5	57,25	+ 0,5
	5,12	2,93	57,2	57,25	— 0,1
	7,12	4,08	57,3	57,25	+ 0,1
	6,97	3,99	57,25	57,25	0
	7,35	4,23	57,5	57,25	+ 0,5
$HCO_2, (CH_2)_2, Se, CH_2, CO_2H$ ..	8,84	3,37	38,1	37,4	+ 1,9
	9,28	3,50	37,7	37,4	+ 0,8
	10,25	3,83	37,3	37,4	- 0,3
$HCO_2, (CH_2)_2, Se, (CH_2)_2, CO_2H$	11,85	4,21	35,5	35,1	+ 1,1
	10,25	3,62	35,3	35,1	+ 0,6
	12,18	4,30	35,2	35,1	+ 0,3
Séléniure de méthylétain*	9,41	4,47	47,5	47,3	+ 0,4
	8,74	4,17	47,7	47,3	+ 0,8
Séléniure d'éthylétain*	10,60	4,77	45,0	44,9	+ 0,2
	10,77	4,87	45,2	44,9	+ 0,7

* Ces deux composés, de *Tchakirian* et *Bevillard*, renferment environ 0,5% de sélénium libre.

Après 5 minutes, on siphonne la liqueur surnageante sur micro-filtre de *Pregl* N° 1, garni d'amiante serrée et taré, on reprend le précipité par quelques ml d'acide chlorhydrique concentré, puis, après siphonnage, successivement par une dizaine de ml d'eau froide — qui dissout le chlorure de sodium — et par de l'eau bouillante. En agitant de façon que le précipité se mette en suspension, le sélénium rouge se transforme en sélénium noir, que l'on entraîne sur le filtre par additions répétées d'eau bouillante, puis d'alcool.

Le micro-filtre contenant le précipité est enfin séché pendant 10 minutes au bloc chauffant à 105°, avec aspiration d'air, essuyé et taré. On obtient ainsi directement le poids de sélénium contenu dans la prise d'essai*.

Les résultats sont résumés dans le Tableau II. Ils accusent une approximation de $\pm 1\%$.

Résumé.

Les méthodes décrites dans la littérature ne concernent généralement pas le dosage du sélénium sur de petites quantités de composés organo-séléniés. Nous avons établi une méthode de minéralisation qui repose sur l'attaque nitro-perchlorique de la matière organique. Une partie du sélénium est entraîné par les vapeurs, mais se trouve arrêté par un piège à eau distillée. Le sélénium est précipité par réduction au moyen d'anhydride sulfureux en milieu fortement acide, il est filtré et pesé à l'état de sélénium noir, suivant la méthode classique spécialement adaptée au liquide résultant de ce procédé d'attaque. La méthode est rapide et fournit des résultats à $\pm 1\%$ près.

Zusammenfassung.

Die in der Literatur beschriebenen Methoden beziehen sich im allgemeinen nicht auf die Bestimmung von Selen in kleinen Mengen organischer Selen-Verbindungen. Es wurde ein Verfahren für die Veraschung ausgearbeitet, welches auf der Zerstörung mit Perchlorsäure und Salpetersäure beruht. Ein Teil des Selens wird hierbei von den Dämpfen mitgerissen, findet sich dann aber in einer Vorlage von destilliertem Wasser. Es wird nach dem klassischen, diesem Fall eigens angepaßten Verfahren durch Reduktion mittels Schwefeldioxyd in stark saurem Milieu gefällt und nach Filtration als schwarzes elementares Selen gewogen. Die Methode ist rasch durchführbar und ergibt auf $\pm 1\%$ genaue Resultate.

Summary.

The methods given in the literature usually are not concerned with the determination of selenium in small quantities of seleniferous organic materials. We have developed a method of mineralization which is based on the destruc-

* Nous remercions *M. Cagniant*, de Strasbourg, *M. Bevillard*, de Paris[8], et *M. Fredga*, d'Upsal, qui ont bien voulu nous confier les échantillons de produits purs sur lesquels ont porté ces essais.

tion of the organic matter by nitro-perchloric acid. Part of the selenium is entrained by the vapors, but this is caught in distilled water trap. The selenium is reduced, in a strongly acid medium, by sulfur dioxide. It is filtered, and weighed as black selenium, according to the classic method especially to the liquid obtained by this method of attack. The procedure is rapid and gives results within about $\pm 1\%$.

Bibliographie.

[1] *E. Abramson* et *E. Kahane*, Bull. soc. chim. France **15**, 1146 (1948).
[2] *D. F. Adams* et *L. I. Gilbertson*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **14**, 926 (1942.)
[3] *H. K. Alber* et *J. Harand*, J. Franklin Inst. **228**, 243 (1939).
[4] *R. Berg* et *M. Teitelbaum*, Analyst **53**, 241 (1928).
[5] *L. Bertiaux*, Ann. chim. anal. **27**, 209 (1945).
[6] *P. Bevillard* et *A. Tchakirian*, Bull. soc. chim. France (en cours d'impression).
[7] *O. Blot*, thèse Paris 1932.
[8] *L. M. Clark*, J. Chem. Soc. London **1927**, 2805.
[9] *W. C. Coleman* et *C. R. McCrosky*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **8**, 196 (1936).
[10] *W. C. Coleman* et *C. R. McCrosky*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **9**, 431 (1937).
[11] *W. C. Coleman* et *C. R. McCrosky*, J. Amer. Chem. Soc. **59**, 1458 (1937).
[12] *L. A. Congdon* et *W. W. Bray*, Chem. News **128**, 266 (1924).
[13] *A. L. Curl* et *R. A. Osborn*, J. Ass. Off. Agr. Chem. **21**, 228 (1938).
[14] *C. W. Davis*, Canad. J. Res. **16**, B, 227 (1938).
[15] *M. Delepine*, Bull. soc. chim. France **8**, 685 (1941).
[16] *G. Denigès*, Bull. trav. soc. pharm. Bordeaux **75**, 197 (1937).
[17] *S. M. de Salas*, Anales assoc. quim. Argentina **33**, 143 (1945).
[18] *R. Dolique*, *J. Giroux* et *S. Perahia*, Bull. soc. chim. France **13**, 48 (1946).
[19] *R. Dolique*, *J. Giroux* et *S. Roca*, Bull. soc. chim. France **10**, 49 (1943).
[20] *R. Dolique* et *S. Perahia*, Bull. soc. chim. France **13**, 44 (1946).
[21] *M. R. Dolique* et *S. Roca*, Bull. soc. chim. France **10**, 274 (1943).
[22] *H. D. K. Drew* et *C. R. Porter*, J. Chem. Soc. London **95**, 2091 (1929).
[23] *P. Falciola*, Ann. chim. applic. **17**, 357 (1927).
[24] *K. W. Franke*, *R. Burris* et *R. S. Hutton*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **8**, 435 (1936).
[25] *A. Fredga*, J. prakt. Chem. **121**, 57 (1929).
[26] *A. Fredga*, Svensk. Kem. Tidskr. **50**, 2 (1928).
[27] *Th. Goffin-Octors*, Ing. chimiste (Bruxelles) **24**, 57 et 81 (1940).
[28] *R. A. Gortner* et *H. B. Lewis*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **11**, (1939).
[29] *S. Hirano*, J. Soc. Chem. Ind. Japan (Suppl.) **41**, 266 B (1938). **198**
[30] *V. Hovorka*, Coll. trav. chim. Tschécoslovaquie **4**, 300 (1932).
[31] *V. Hovorka*, Chem. Listy Vedu Prumysl **29**, 73 (1935).
[32] *E. Kahane*, Action de l'acide perchlorique sur les matières organiques et ses applications analytiques, Hermann et Cie, éd., Paris 1934.
[33] *E. Kahane*, Bull. soc. chim. France **1**, 190 (1934).
[34] *E. Kahane* et *M. Kahane*, Bull. soc. chim. France **1**, 280 (1934).
[35] *E. Kahane*, J. pharm. chim. **19**, 26 (1934).
[36] *E. Kahane* et *T. Tomesco*, Bull. soc. chim. France **3**, 1682 (1936).

[37] *E. Kahane*, Z. analyt. Chem. **111**, 14 (1937).
[38] *H. Kato, H. Hosimiya* et *S. Nakazima*, J. Chem. Soc. Japan **60**, 1115 (1939).
[39] *A. K. Klein*, J. Assoc. Official Agr. Chem. **24**, 368 (1941).
[40] *J. J. Lingane* et *L. Niedrach*, J. Amer. Chem. Soc. **70**, 1997 (1948).
[41] *J. D. Mac Cullough, T. W. Campbell* et *N. J. Krilanovich*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **18**, 638 (1946).
[42] *J. G. Mackay* et *C. H. Avons*, Trans. Inst. Rubber Ind. **12**, 471 (1937).
[43] *J. S. Mac Nulty*, Analyt. Chemistry **19**, 809 (1947).
[44] *J. Meyer* et *W. von Garn*, Z. analyt. Chem. **53**, 2933 (1914).
[45] *J. Milbauer*, Chem. Obzor. **15**, 145 (1940).
[46] *G. G. Pierson*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **6**, 437 (1934).
[47] *N. S. Poluektow*, Chem. Zbl. **1940**, II, 1757.
[48] *P. Saccardi* et *G. Martini*, Chimica **13**, 210 (1937).
[49] *W. R. Schoeller*, Analyst **64**, 318 (1939).
[50] *W. T. Schrenk* et *B. L. Browing*, J. Amer. Chem. Soc. **48**, 2550 (1926).
[51] *A. S. Schakhov*, Zavodskaya Lab. **11**, 893 (1945).
[52] *E. H. Shaw* jr. et *E. E. Reid*, J. Amer. Chem. Soc. **49**, 2330 (1927).
[53] *Z. Shibata*, Sci. Rep. Tôhoku Imp. Univ. **26**, 248 (1937).
[54] *Silverthorn*, Chemist Analyst **30**, 52 et 62 (1941).
[55] *K. Someya*, Z. anorg. Chem. **187**, 337 (1930).
[56] *G. C. Soth* et *J. E. Ricci*, Ind. Engng. Chem. Analyt. Ed. **12**, 328 (1940).
[57] *P. Spacu*, Bull. soc. chim. France **3**, 159 (1936).
[58] *H. Stamm* et *M. Goehring*, Z. analyt. Chem. **120**, 230 (1940).
[59] *F. Taboury*, Ann. chim. phys. **15**, 54 (1908).
[60] *M. F. Taboury* et *J. Queuille*, C. r. acad. sci., Paris **217**, 150 (1943).
[61] *A. Tettamanzi*, Atti. r. acad. sci. Torino **75**, 1, 402 (1940).
[62] *O. Tomicek*, Bull. soc. chim. France **41**, 1389 (1927).
[63] *O. Tomicek, O. Procke* et *V. Pavelka*, Collect. trav. chim. tchèq. **11**, 449 (1939).
[64] *S. Umezawa*, Bull. Chem. Soc. Japan **14**, 153 (1939).
[65] *J. H. van der Meulen*, Chem. Weekbl. **31**, 333 (1934).
[66] *L. Vignoli* et *R. Savelli*, Journ. pharm. chim. **27**, 437 (1938).
[67] *L. Vignoli* et *R. Savelli*, Bull. pharm. Sud-Est **42**, 165 (1938).
[68] *P. von Stein*, Chemist. Analyst **33**, 15 (1944).
[69] *G. Wernimont* and *F. J. Hopkinson*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **12**, 308 (1940).
[70] *K. T. Williams* and *H. C. Byers*, Ind. Engng. Chem. **28**, 912 (1936).
[71] *K. T. Williams* and *H. W. Lakin*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **7**, 409 (1935).

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Bern.

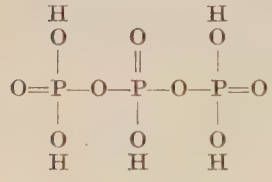
Die scandiumspezifische Gruppe der Pyrophosphorsäuren.

Von

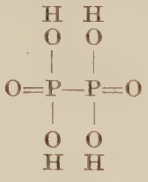
G. Beck.

(Eingelangt am 31. Mai 1950.)

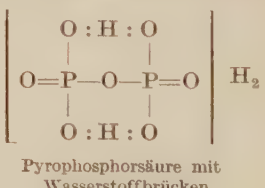
Bei der Untersuchung über das Verhalten des Scandiums gegenüber den verschiedenen Phosphorsäuren[1] zeigt es sich, daß dieses Element eine ausgeprägte Verwandtschaft zur Pyrophosphorsäure besitzt. Es weist als einziges Element ein ausgesprochenes Extremum in bezug auf die Affinität zu dieser Säure auf. Dasselbe gilt auch für die Triphosphate vom Typus $Me_5P_3O_{10}$, die als Salze einer höheren Pyrophosphorsäure



Triphosphorsäure.



Subphosphorsäure.



Pyrophosphorsäure mit Wasserstoffbrücken.

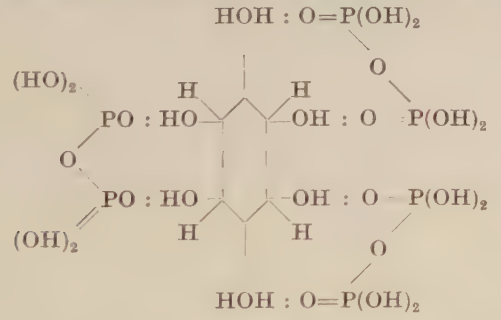
aufgefaßt werden können, und für die Subphosphate $Me_4P_2O_6$. Es ist auch bemerkenswert, daß im Thortveitit $Sc_2Si_2O_7$, dem Hauptvorkommen des Scandiums als selbständiges Mineral, eine dem Pyrophosphation ähnliche Atomgruppierung vorliegt mit ungefähr der gleichen räumlichen Größe. Das Scandium wird sich daher aus gewissen Magmen als besonders schwer lösliches $Sc_2Si_2O_7$ ausscheiden.

Das Scandiumphosphat $ScPO_4$ ist, wie die Phosphate der meisten dreiwertigen Elemente, unlöslich in Essigsäure, aber sehr leicht in verdünnten Mineralsäuren. Durch wäßrige Alkalien kann aber die Phosphorsäure nie quantitativ entzogen werden[2]. Das Pyrophosphat $ScHP_2O_7 \cdot 3\,H_2O$ entspricht in der Zusammensetzung den Pyrophosphaten der Seltenen Erden, es ist aber neben denjenigen des Zirkons, Hafniums und Thoriums das einzige, das auch in konzentrierten Mineralsäuren

unlöslich ist. Es löst sich außerdem nur langsam und erst in der Wärme mit Natriumpyrophosphat auf, während dies bei Zirkon, Hafnium und Thorium spielend leicht geschieht. Auch in anderen komplexbildenden Salzen, wie Tartrat, Oxalat und Nitriloacetat, löst es sich am schwersten, leicht dagegen in Alkalifluorid.

Infolge der extremen Affinität kann man Pyrophosphat zur Abscheidung des Sc aus stark saurer Lösung benützen, wobei man bei Anwesenheit von nur geringen Mengen Scandium Schwermetalle, wie Eisen, in der Weise als Spurenfänger benützen kann, daß man die Acidität der Lösung so weit herabsetzt, daß auch etwas Ferripyrophosphat ausfällt.

Ebenso ausgeprägt ist die Schwerlöslichkeit des Scandiumphytats (Scandiuminosithexaphosphat). Es wurde daraus geschlossen, daß das Phytin ein Ester der Pyrophosphorsäure mit Inosit sei, was schon früher von *Starkenstein*[3] angenommen wurde auf Grund des Verhaltens bei der Titration des Phytins mit Uranylacetat. Man muß annehmen, daß das Pyrophosphat mit je 2 Wasserstoffbrücken an den Inosit gebunden ist. Auf diese Eigenschaft der Pyrophosphorsäure, Wasserstoffbrücken zu bilden, hat kürzlich *Schwarzenbach* hingewiesen bei der Untersuchung über den Titrationsverlauf dieser Säure[4]. Die Formulierung des Phytins als Ester der Pyrophosphorsäure steht auch im Einklang mit der Komplexzahl 4 des Phosphors, was bei der Auffassung als Inosithexaphosphat nicht der Fall ist, wo der Phosphor fünfbindig sein müßte. Auch sind bis jetzt höchstens 12-basische Salze bekannt, d. h. daß alle 4 H-Atome der 3 Pyrophosphorsäurereste ersetzt sind, während bei der Auffassung als Inosithexaphosphat 18-basische Salze zu erwarten wären.



Phytin.

Mit Phytin als Fällungsmittel gelingt es nun, die Spuren Scandium, die in Pflanzen und tierischen Organen, aber auch in vielen Mineralstoffen vorhanden sind, abzuscheiden und so weit anzureichern, daß der Nachweis auf mikrochemischem Wege möglich wird. Es hat sich aus den bisherigen Versuchen gezeigt, daß das Scandium als ständiger Begleiter der mineralischen Bestandteile von Leber, Niere und Blut auftritt

in Mengen von 50 bis 100 γ/kg. Ferner scheint es speziell in den grünen Pflanzenteilen, den Blättern, vorzukommen. Aus 100 g getrockneten Brombeerblättern wurden über das Phytat 400 γ Sc_2O_3 isoliert; es wurde ferner im Kohl und in Bohnen, bedeutend weniger in Äpfeln, Mehl, Brot und Kartoffeln gefunden.

Erwartungsgemäß zeigt auch das Scandiumsalz der Cocarboxylase, das ist der Pyrophosphorsäureester des Aneurins (Vitamin B_1), extreme Schwerlöslichkeit. Es ist neben dem des Zirkons das einzige, das in Mineralsäuren unlöslich ist. Dasselbe ist der Fall bei der Adenosintriphosphorsäure; denn das Scandium- und das Zirkonsalz sind die einzigen, die in Essigsäure unlöslich sind. Dagegen sind die Glycero- und Glycosephosphate des Scandiums in Wasser leicht löslich.

Es ist daher zu erwarten, daß diese wichtigen Pyrophosphorsäureester durch Scandium in ihrer biologischen Wirkung spezifisch gehemmt werden. Auch gelingt es sehr rasch, mit Scandium die Cocarboxylase aus biologischem Material abzuscheiden.

Zusammenfassung.

Das Scandium gibt mit Pyrophosphat und verschiedenen Derivaten, wie Aneurinpyrophosphat, Inositpyrophosphat (Phytin) und Adenosintriphosphat, Niederschläge, welche sich durch extreme Schwerlöslichkeit zum Teil sogar in Mineralsäuren auszeichnen.

Summary.

Precipitates, which are characterized by extremely low solubility, in part even in mineral acids, are produced by scandium solutions on treatment with pyrophosphate and various derivatives, such as aneurinphosphate, inositolphosphate (phytin), and adenosin triphosphate.

Résumé.

Le scandium donne avec les pyrophosphates et divers dérivés comme le phosphate d'aneurine, le pyrophosphate d'inositol (phytine) et le triphosphate d'adénosine, des précipités qui se font remarquer partiellement par une extrême insolubilité même dans les acides minéraux.

Literatur.

[1] *G. Beck*, Mikrochem. **34**, 62 (1948); **34**, 282 (1949); Analyt. Chim. Acta **4**, 21 (1950).

[2] *W. Fischer* und *R. Bock*, Z. anorg. Chem. **249**, 164 (1942).

[3] *E. Starkenstein*, Z. Biochem. **30**, 56 (1911).

[4] *G. Schwarzenbach*, Monatsh. Chem. **81**, 202 (1950).

Faculté de Pharmacie de Paris — Chaire de Chimie Analytique.

Sur une combinaison borotartrique et son application à la recherche et au dosage microchimiques de l'ion borique.

Par

J. A. Gautier et **P. Pignard.**

Avec 1 figure.

(Reçu le 18 juillet 1950.)

1. Introduction.

Les nombreuses méthodes de recherche et de dosage de l'acide borique et des borates applicables aux faibles quantités sont pour la plupart basées sur la colorimétrie, telles les excellentes techniques à la teinture de curcuma données par *G. Bertrand* et *Agulhon*[1] ou l'essai à la quinalizarine[2]: en dépit de leur intérêt, elles tombent sous le grief commun à toutes les méthodes colorimétriques et ne présentent pas, en général, les garanties de précision et de spécificité des procédés gravimétriques ou volumétriques fondés sur une réaction stoechiométrique définie; quant aux techniques acidimétriques en présence de polyols, elles permettent malaisément de doser des masses de bore inférieures au mg. Il était tentant de rechercher dans le faible poids atomique de ce métalloïde la base de procédés analytiques plus fructueux et il nous est venu à l'idée de nous adresser à des combinaisons borotartriques de métaux lourds, affectées, vis à vis du bore, de coefficients de transformation favorables.

Nous croyons avoir trouvé la solution du problème dans l'isolement d'un borotartrate de baryum, suffisamment insoluble en milieu alcalin et stable dans les conditions usuelles de dessiccation et de pesée; la précipitation de ce composé nous a semblé applicable à la recherche de l'ion borique ainsi qu'à son dosage semi-microchimique et microchimique par les voies habituelles de la gravimétrie et de la volumétrie.

L'existence de ce borotartrate, qu'on doit sans doute rapprocher des complexes qu'ont étudiés en de nombreuses publications *Boeseken*, *Lowry*, *Darmois*, *Meulenhoff*, *Kolthoff* et leurs élèves, pose par ailleurs maints problèmes d'ordre théorique; on sait en effet à quel point la constitution des

curieuses combinaisons nées de l'acide borique et des corps organiques hydroxylés a été et est encore sujette à controverse. Cet aspect de la question sera ici délibérément négligé et nous envisagerons le côté purement analytique et pratique de la réaction. L'étude de la constitution intime du composé précipité, que nous nommerons provisoirement borotartrate de baryum, est en voie d'achèvement et sera développée dans un autre recueil.

Il nous suffit, en effet, pour l'application analytique, d'être renseignés sur sa composition centésimale, sur le coefficient de transformation qu'elle implique et sur les caractères courants de stabilité et de solubilité.

2. Principe de la méthode.

On sait qu'en présence d'un tampon suffisant de $ClNH_4$ le tartrate de baryum, quoique peu soluble dans l'eau, demeure en solution jusqu'à une concentration assez élevée; nous avons observé que l'addition d'ion borique à une telle solution détermine en milieu ammoniacal la formation d'un précipité de composition fixe, contenant en proportions définies de l'acide tartrique, du Bore et du Baryum. Cette substance apparaît donc comme un individu chimique distinct et présente au microscope un aspect caractéristique. Elle est donc de nature à se prêter à une recherche et à un dosage particulièrement sensibles du Bore, lequel entre dans sa constitution pour une proportion définie extrêmement minime.

3. Réactif de précipitation.

Le réactif que nous préconisons tient compte des caractères de solubilité du tartrate de baryum, d'une part et du borotartrate, d'autre part; la formule ci-dessous évite, dans les conditions précisées plus loin, tout entraînement de tartrate de baryum en excès lors de la précipitation du borotartrate:

Cl_2Ba, 2 H_2O	13 g.
Acide tartrique droit	14 g
$ClNH_4$	240 g
Eau q. s. p.	1000 ml

La solution filtrée après 24 heures offre une réaction acide (p_H un peu inférieur à 2) et se conserve indéfiniment.

Pour l'emploi, on l'alcalinise par le dixième de son volume de NH_4OH concentrée (15 n) ce qui porte le p_H aux environs de 8,8: cette addition doit être faite extemporanément; elle peut déterminer en effet, en dépit du caractère tampon de la solution, la précipitation lente de cristaux de tartrate de baryum, dont l'aspect bien connu serait d'ailleurs caractéristique.

4. Étude du précipité de borotartrate.

Comme nous l'avons signalé plus haut, nous n'envisagerons pas ici l'étude complète du borotartrate précipité; nous résumons pourtant

ci-dessous la description de son isolement et de son analyse dans le but de justifier son caractère d'individu chimique et de donner ainsi aux méthodes analytiques que nous proposons une base rationnelle.

Isolement du précipité. A un volume de solution d'acide borique ou de borate, de concentration voisine de 10^{-4} (exprimée en masse de Bore B), on ajoute 4 à 5 volumes du réactif alcalinisé; il apparaît rapidement un précipité blanc, opaque, se sédimentant facilement.

On le sépare par filtration ou centrifugation et on le lave avec NH_4OH très diluée.

Caractères du précipité. Il forme des sphérules caractéristiques (voir fig. 1) constituées vraisemblablement par des agrégats cristallins dont l'examen est en cours, en connexion avec l'étude de la constitution. Ces cristaux sont pratiquement insolubles dans l'eau froide, légèrement solubles à chaud, insolubles dans l'eau chargée de NH_4OH : ils se dissolvent dans les solutions acides.

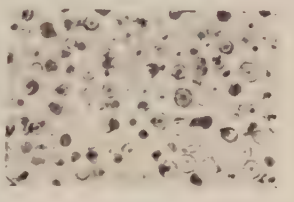


Fig. 1.

Composition: Celle-ci a été déterminée sur le précipité desséché à + 110° C jusqu'à poids constant. Dans ces conditions de siccité, il tend à se réhydrater rapidement à l'air en absorbant 5 à 6% d'eau.

Au-dessus de cette température, il perd progressivement une nouvelle quantité d'eau, charbonne vers 350° C et abandonne finalement un résidu blanc formé de CO_3Ba, de métaborate $(BO_2)_2Ba$ et d'un excès de baryte caustique.

Des essais conduits à l'aide de la balance de *Chévenard*, grâce à l'obligeance de *M. Clément Duval*, précisent les modalités de la décomposition thermique et seront exposés ultérieurement.

La constitution exacte du borotartrate de baryum est malaisée à établir, du fait, d'une part, de l'absence de données définitives sur le mode de liaison général entre l'acide borique et les corps organiques hydroxylés, d'autre part, des difficultés techniques de l'analyse; en particulier, le dosage de l'eau de constitution stable à 110° C, dont la présence est indiscutable, s'avère délicat, car l'élimination thermique des dernières traces d'eau coïncide avec le début de la pyrogénation de l'acide tartrique du complexe.

L'analyse centésimale après dessiccation à + 110° C a donné les résultats suivants:

Acide tartrique — Dosé par le procédé periodimétrique[3, 4]. Approximation ± 3%. Trouvé 43% (en acide $C_4H_6O_6$).

Carbone — Dosé par combustion. Trouvé: 13,8%.

Bore — Dosé par acidimétrie en présence de glycérol: on a vérifié que dans les conditions opératoires l'acide tartrique du borotartrate n'entache pas d'erreur le résultat[5]. Trouvé 1,55% (en B).

Baryum — Dosé par gravimétrie (SO_4Ba); Trouvé: 47,60%.

Eau — Dosée par pyrolyse (thermogravimétrie): à 300°, la perte est de 7,8%.

Chaque résultat est la moyenne de plusieurs déterminations dont la dispersion n'excède pas l'approximation recevable. L'ensemble est en accord avec la composition moléculaire suivante:

$$(1)\quad 4\,(CO_2 - CHOH - CO_2)^{2-},\ 2\,(BO_2)^{-},\ 5\,Ba^{2+},\ 4\,H_2O^{*}$$

qui correspond aux chiffres calculés ci-dessous:

Acide tartrique	41,75%	
Carbone	13,36%	
Bore (en B)	1,50%	
Baryum	47,80%	
Eau	Pour les 4 molécules en évidence	5,0%
	compte tenu des OH de l'acide tartrique	10,0%

Comme il arrive pour les combinaisons complexes de ce type, il règne donc une indécision sur la teneur exacte en H_2O; à la température de 300° C, la perte en eau excède les 4 molécules mises en évidence ci-dessus, sans épuiser les possibilités de déshydratation intégrale des OH alcooliques de l'acide tartrique.

Nous croyons pourtant pouvoir nous en tenir pour le moment à cette formule; du point de vue qui nous occupe ici, elle a le mérite de dégager un coefficient de transformation théorique $\frac{\text{Masse moléculaire}}{\text{Bore (en B)}}$ égal à 66.4, ce qui est tout-à-fait en accord avec l'expérience de très nombreuses déterminations (66,5 trouvé).

5. Application à la recherche de l'ion borique.

La précipitation du borotartrate de baryum à l'aide du réactif susindiqué fournit une bonne méthode de recherche de l'ion borique en solution. Le protocole est le même que celui que nous décrivons au paragraphe précédent («isolement du précipité»). On peut opérer indifféremment en tube à essai ou en semi-microtechnique (mélange de gouttes en cupule noire). Le précipité caractérise l'ion borique et peut être examiné au microscope.

Sensibilité de la réaction: 10^{-5} en dilution et 5 γ en Bore.

* Nous donnons intentionnellement cette formule sous forme ionique pour ne pas préjuger de la constitution réelle du composé boro-tartrique: le bore y figure conventionnellement sous forme d'ion métaborique $O = B - O^{-}$.

Cas de l'analyse systématique: En solution minérale complexe, les ions perturbateurs sont ceux que précipitent Ba^{2+} et NH_4OH; on les éliminera de la façon suivante:

A la prise d'essai de solution, ajouter un excès de ClH 2n pour détruire les carbonates, introduire ensuite un excès de $Cl_2Ba \cdot 2\,H_2O$ (0,2 m) et alcaliniser franchement par NH_4OH (1,5 n). Filtrer s'il y a lieu, après quelques minutes et s'assurer que le filtrat ne précipite plus par Cl_2Ba.

La recherche s'exécute comme plus haut sur le filtrat.

Si la liqueur primitive contenait des substances organiques hydroxylées on les éliminerait par calcination.

6. Application au dosage gravimétrique de l'ion borique (semi-microtechnique).

L'isolement du précipité de borotartrate de baryum est quantitatif si l'on opère dans certaines limites, d'ailleurs assez larges, de concentration et en utilisant comme liquide de lavage un mélange d'ammoniaque et d'acétone. On n'observe, dans ces conditions, ni dissolution, ni surcharge.

A une prise d'essai de 1 à 10 ml contenant 200 γ à 10 mg de Bore, ajouter 8 à 10 volumes de Réactif alcalinisé. Laisser sédimenter pendant une heure au moins le précipité formé et le recueillir sur filtre en verre fritté (G 4).

Laver par décantation avec la solution suivante:*

NH_4OH 15 n	2 volumes
Eau distillée	1 volume
Acétone	1 volume

Tableau 1.

Bore (en B) de la prise d'essai	Masse du précipité	Bore (en B) trouvé	Erreur %
10 mg	663 mg	9,97 mg	— 0,3
10 mg	670 mg	10,07 mg	+ 0,7
5 mg	336,5 mg	5,05 mg	+ 1
2 mg	131,6 mg	1,97 mg	— 1,5
500 γ	33,000 γ	495 γ	— 1
400 γ	26,400 γ	396,5 γ	— 0.9
300 γ	20,500 γ	308 γ	+ 2,7
200 γ	13,200 γ	198 γ	— 1
120 γ	8,300 γ	125 γ	+ 4

Entraîner finalement la totalité du précipité dont une partie adhère fortement aux parois; vérifier que le liquide de lavage ne précipite plus

* A préparer extemporanément.

l'ion SO_4^{2-} ; achever le lavage sur le filtre avec quelques ml d'alcool à 95%; sécher à l'étuve à + 110° C à poids constant (le refroidissement se fera en exsiccateur, le précipité fixant rapidement l'humidité).

Calcul: Le poids de précipité divisé par 66,5 représente la masse de bore (exprimée en B) de la prise d'essai.

Ce coefficient expérimental a été contrôlé par de nombreux essai; nous avons vu son accord avec la composition centésimale du borotartrate. Un certain nombre de nos résultats sont reproduits dans le tableau 1.

7. Application au dosage volumétrique (micro-technique).

Ce procédé s'applique aux prises d'essai inférieures à 200 γ en bore; nous avons obtenu des résultats encore satisfaisants avec 30 γ.

Principe du dosage: Dans le borotartrate isolé comme précédemment, le baryum est dosé par iodométrie après transformation en chromate. A cet effet, le précipité est redissous dans ClH et la solution obtenue additionnée de CrO_4K_2 puis alcalinisée par NH_4OH. Nous avons vérifié que, dans les conditions de concentration précisées plus bas, Ba^{2+} précipite quantitativement et exclusivement sous la forme CrO_4Ba. Ce dernier, isolé à son tour, est redissous en milieu acide et l'ion chromique lié au baryum est titré par iodométrie.

La prise d'essai doit avoisiner 3 ml (ramener au besoin à ce volume par concentration); on y ajoute 5 ml de réactif alcalinisé et on laisse précipiter pendant 3 h. au moins dans l'eau glacée (la solubilité à la température ambiante, bien que faible, n'est plus négligeable).

Tableau 2.

Bore (en B) de la prise d'essai (en γ)	Bore (en B) trouvé (en γ)	Erreur en %
30	28,4	— 5,3
50	48,2	— 3,6
50	51,3	+ 2,6
50	50,4	+ 0,8
70	68,8	— 1,7
80	78,1	— 2,4
100	96,5	— 3,5
100	103	+ 3,0

Séparer et laver le précipité par centrifugation avec le liquide de lavage indiqué plus haut; dissoudre enfin dans le tube à centrifuger au moyen de 5 ml de ClH (0,5 n); ajouter 1 ml de CrO_4K_2 (0,5 m) et 1 ml de NH_4OH (1,5 n). Au bout de 30 minutes, laver après décantation le nouveau précipité formé par centrifugation avec de l'eau distillée. Le chromate de baryum est alors dissous dans la quantité suffisante de ClH (0,5 n); on ajoute un décigramme environ de IK et titre après quelques minutes l'iode libéré par $S_2O_3Na_2$ (0,02 n ou 0,01 n).

Calcul: Le calcul a été basé sur les rapports de transformation $\frac{B}{Ba}$ du borotartrate, $\frac{Ba}{CrO_4^{2-}}$ du chromate, et sur l'équivalent oxydimétrique du chromate.

Il en résulte la correspondance suivante:

1 ml $S_2O_3Na_2$ 0,02 n correspond à 28,8 γ de B
1 ml $S_2O_3Na_2$ 0,01 n correspond à 14,4 γ de B.

Voir quelques résultats consignés dans le tableau 2.

8. Dosage en solution complexe.

Le même principe de dosage du Bore peut encore être appliqué avec succès au cas des milieux complexes minéraux, organiques, voire biologiques.

En milieu minéral, on utilise la méthode d'isolement exposée au § 5, à l'occasion de la recherche purement qualitative; en vue de pallier aux entraînements inévitables, générateurs de pertes en bore, on prend soin de redissoudre le précipité de sels étrangers éliminés pour procéder sur la solution obtenue à une nouvelle extraction de l'ion borique entraîné; on répète deux fois cette opération.

En milieu organique ou biologique, on calcine avec certaines précautions et on opère sur les cendres redissoutes. Dans ce dernier cas, il apparaît parfois plus pratique d'isoler d'abord le Bore sous forme d'ester distillable[6, 7] et de soumettre celui-ci, après saponification, aux modes de dosage précédents.

Ces compléments au travail qu'on vient de lire seront exposés en détail à l'occasion de diverses applications intéressantes.

9. Conclusions.

En résumé, les procédés que nous préconisons permettent la recherche et le dosage du Bore à l'échelle microchimique et semi-microchimique; basés sur une réaction stoechiométrique, ils sont, partant, plus fidèles que les techniques colorimétriques dont un bon nombre sont fortement entachées d'empirisme: en matière de sensibilité, ils ne le cèdent que de fort peu à ces dernières, grâce à des coefficients de transformation gravimétriques et à des rapports de correspondance volumétriques assez rarement atteints; ils paraissent susceptibles d'adaptation aux méthodes classiques d'isolement du bore en milieu complexe et seront de ce fait propres à en augmenter la sensibilité et la fidélité.

Nous nous proposons d'examiner les applications pratiques de ces méthodes à l'analyse organique et biologique.

Nous nous réservons également de préciser la structure intime du borotartrate de baryum qui se classera vraisemblablement dans la série des complexes organiques du bore, et d'étudier parallèlement les combinaisons analogues des autres métaux alcalino-terreux.

Zusammenfassung.

Bei Gegenwart von Weinsäure läßt sich Borat mit Barium in Form eines Niederschlages konstanter Zusammensetzung (wahrscheinlich als komplexes Bariumborotartrat) und sehr geringer Wasserlöslichkeit fällen, dessen Analyse der Formel $Ba_5B_2C_{12}H_8O_{24} \cdot 4\,H_2O$ entspricht. Der qualitative Bornachweis ist mit Hilfe dieser charakteristisch geformten Fällung bis zu einer Grenzkonzentration von 10^{-5} zu führen. Ein Verfahren zur gravimetrischen Borbestimmung im Halbmikromaßstab und eine Methode zur volumetrischen Mikrobestimmung des Bors über die jodometrische Erfassung des Bariums als Chromat wird angegeben, wobei 1 ml 0,01-n-Thiosulfatlösung 14,4 γ B entspricht. Das Prinzip dieser Methode läßt sich auch auf komplexe anorganische, organische bzw. biologische Lösungen nach deren Veraschung anwenden.

Summary.

In the presence of tartaric acid, borate reacts with barium to produce a precipitate of constant composition and very low water-solubility. The analysis of this presumably complex barium borotartrate yields to empirical formula $Ba_5B_2C_{12}H_8O_{24} \cdot 4\,H_2O$. The qualitative detection of boron by means of this characteristic precipitate has a limiting concentration of 10^{-5}. A method is described for the gravimetric determination of boron on the semi-micro scale, and also a volumetric method for the micro-determination of boron, which employs the iodometric measurement of barium as chromate, where 1 ml of 0,01 N thiosulfate solution corresponds to 14,4 γ B. The principle of this method can be also applied to complex inorganic, organic or biological solutions, after ashing.

Discussion.

Mr. *A. Claassen* (Eindhoven, Holland): Est-ce que les fluorures interfèrent?

Mr. *J. A. Gautier*: Oui, puisqu'ils précipitent par Ba^{2+} en milieu NH_4OH: ils doivent donc être éliminés, au préalable, en analyse qualitative systématique, comme expliqué au § 5; et en analyse quantitative, comme prévu au § 8 («dosage en solution complexe»).

Mr. *H. Sachse* (Heidenheim-Mergelstetten, Allemagne): Comment peut-on éviter l'interférence des autres sels insolubles du baryum, par exemple des anions F', CO_3'', etc.?

Mr. *J. A. Gautier*: On les précipite d'abord avec $BaCl_2$ et on élimine ces anions interférants. Alors on précipite le complexe boro-tartrique.

Mr. *E. Stocker* (Horn, Suisse): Kann man auch die entsprechenden Zirkon- oder Aluminiumsalze herstellen, oder auch Zinksalze?

Mr. *J. A. Gautier*: Diese Frage wurde noch nicht geprüft, ist aber in Bearbeitung.

Bibliographie.

[1] *G. Bertrand* et *H. Agulhon*, C. r. acad. sci., Paris **157**, 1433 (1913) et **158**, 201 (1914).

[2] *F. Feigl* et *P. Krumholz*, Mikrochem., *Pregl*-Festschrift 79 (1929).

[3] *P. Fleury* et *J. Lange*, C. r. acad. sci., Paris **195**, 1395 (1932).

[4] *G. Bon-Bernatets*, Thèse Doct. Univ. (Pharm.), Paris 1933.

[5] *I. M. Kolthoff*, Rec. trav. chim. Pays-Bas **45**, 607 (1926).

[6] *Rosenbladt*, Z. analyt. Chem. **26**, 18 (1887).

[7] *G. Bertrand* et *H. Agulhon*, Bull. soc. chim. France **7**, 90 (1910).

Laboratoire de recherches du Gaz de France (Gennevilliers).

Sur une méthode de contrôle de la pureté de certains composés organiques.

Par

Henry Gault, Marguerite Dorgans et **Anne-Marie Azières.**

(Reçu le 18 juillet 1950.)

Les auteurs ont soumis à une étude méthodique le phénomène de formation d'anneaux concentriques par évaporation, sur surfaces courbes, de solutions dans des solvants volatils de mélanges de matières organiques solides.

L'objet de la présente communication est d'exposer quelques-uns des premiers résultats obtenus.

Lorsqu'on soumet à l'évaporation des solutions de mélanges de deux substances, on observe la formation d'anneaux séparés et distincts entre lesquels les deux substances se répartissent en proportions variables.

Lorsqu'on soumet à l'évaporation la solution d'un corps renfermant une trace d'une matière étrangère, on constate que cette matière se sépare sous forme d'un anneau ou bien d'une portion d'anneau concentrique distinct. Suivant la nature des produits dissous et du solvant employé, et la concentration des solutions, l'anneau peut être périphérique ou central. La totalité ou, suivant les cas, la presque totalité de la matière étrangère se trouve expulsée de la solution dans le temps nécessaire à la formation de l'anneau correspondant, c'est-à-dire à l'évaporation d'une couronne de liquide de dimensions mesurables.

Description d'une opération. On prépare une solution (éther, alcool ...) à $^{3}/_{10\,000}$ environ, du corps à étudier. Cette solution est versée avec précaution à l'aide d'une ampoule à robinet, graduée et axée sur le centre d'un verre de montre, puis évaporée dans une atmosphère sèche, à l'obscurité et à l'abri de tout courant d'air ou bien dans le vide d'un dessicateur.

Si la séparation de la matière étrangère n'est pas totale en une seule évaporation, on peut, après élimination de l'anneau correspondant, reprendre et dissoudre le corps principal résiduaire et soumettre la nou-

velle solution à une évaporation pratiquée dans les mêmes conditions que la précédente, en répétant ces opérations successives autant de fois qu'il est nécessaire.

L'observation peut être plus particulièrement facile à faire lorsque l'une des deux matières étudiées est fluorescente, c'est-à-dire avec des mélanges:
ou bien d'un corps pur fluorescent avec une matière non fluorescente ou bien d'un corps pur non fluorescent avec une matière fluorescente. Elle est également facile à faire lorsque le corps pur et la matière étrangère étant tous deux fluorescents, leur fluorescence est nettement différente.

Exemples	*Fluorescence*
Anthracène + Naphtacène	Bleu violet et jaune vert.
Pnénanthrène + Naphtacène	Bleu violet et jaune vert.
Acide acétyl-salicylique impur	Bleu pâle et jaune.

Pour certains corps, fluorescents ou non, la caractérisation des constituants peut parfois se faire au microscope (formes cristallines différentes) ou, après séparation à la main des différents anneaux et lorsque les quantités de matière recueillie le permettent, par application des méthodes usuelles d'identification micro-chimique et micro-colorimétrique.

Les auteurs proposent de désigner l'ensemble de ces phénomènes purement physiques sous le nom d'*annellation*, étant assurés qu'il ne pourra donner lieu à aucune confusion avec la conception abstraite d'enchaînement structural.

Il est évident que les opérations d'annellation ne doivent se faire qu'avec des solutions préparées avec des solvants rigoureusement purs et dont la pureté a été contrôlée par évaporation préalable.

D'autre part, il faut éviter de se placer dans des conditions telles que la matière étudiée puisse se modifier partiellement au cours des opérations d'annellation. On conçoit, par exemple, qu'un hydrocarbure polynucléaire puisse se modifier sous l'action de la lumière solaire en engendrant un photoxyde qui jouera le rôle de matière étrangère.

Les modifications que la lumière de Wood peut faire subir à la matière étudiée, pendant l'examen de sa fluorescence, sont moins à redouter: si la lumière de Wood agit, elle agira, en effet, sur la totalité de la matière sensible sans qu'il se crée de nouveaux anneaux.

En résumé, nous pensons que l'annellation peut permettre, d'une part de déceler dans un corps considéré comme pur, la présence de traces d'une matière étrangère et, d'autre part, dans certains cas, d'amener, par annellations successives, un corps organique au degre maximum de pureté qu'il soit possible d'atteindre, compte-tenu de la sensibilité des techniques finales de contrôle. Nous précisons, à ce propos, que le taux,

dans un corps qualifié pur, d'une matière étrangère donnant lieu à annellation, peut être tellement faible que cette matière n'exerce aucune influence sur ses caractéristiques physiques (densité, point de fusion, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, spectre ...).

Les auteurs font remarquer que, dans l'exposé de ses travaux sur la formation d'anneaux concentriques par évaporation de solutions de corps purs, *N. F. Ermolenko*[1] ne donne pas de précision sur le degré de pureté des corps qu'il a étudiés. Il y a lieu de penser, d'ailleurs, que l'évaporation de ces solutions a eu pour premier effet de séparer, des corps purs, la plus grande partie ou la totalité de la matière étrangère qu'ils pouvaient renfermer. Les auteurs poursuivent cette étude.

Résumé.

L'évaporation de solutions de matières organiques dans des solvants volatils donne lieu à des dépôts se présentant sous forme d'anneaux; ce phénomène (Annellation) parait pouvoir être utilisé à la purification de certains corps organiques.

En effet, lorsqu'on soumet à l'évaporation la solution d'un corps renfermant une trace d'une matière étrangère, on constate que cette matière se sépare sous forme d'un anneau ou d'une portion d'anneau concentrique distinct. Suivant la nature des produits dissous et du solvant employé, la concentration des solutions et le rapport en poids de la matière étrangère au corps principal, l'anneau peut être périphèrique, médian ou central.

L'Annellation peut ainsi permettre, d'une part, de déceler dans un corps considéré comme pur, la présence de traces d'une matière étrangère et, d'autre part, dans certains cas, d'amener, par annellations successives, un corps organique au degré maximum de pureté qu'il soit possible d'atteindre, compte tenu de la sensibilité des techniques finales de contrôle.

Zusammenfassung.

Das Verdunsten von Lösungen organischer Substanzen in flüchtigen Lösungsmitteln führt zu Rückständen, die in Form von Ringen erscheinen; dieses Phänomen (Annellierung) scheint zur Reinigung gewisser organischer Körper verwendbar zu sein.

Wenn man nämlich die Lösung eines Stoffes, der spurenweise fremde Substanz enthält, verdunsten läßt, so kann man feststellen, daß sich diese Substanz in Form eines deutlich konzentrischen Ringes oder Ringteiles abtrennt.

Je nach der Natur der gelösten Produkte und des dazu verwendeten Lösungsmittels, der Konzentration der Lösungen und dem Gewichtsverhältnis der fremden Substanz zum Hauptbestandteil kann sich der Ring am Rande oder mehr oder weniger zentral ausbilden.

Auf diese Weise kann die Annellierung einerseits ermöglichen, Spuren einer Verunreinigung in einer scheinbar reinen Substanz nachzuweisen;

anderseits kann so in gewissen Fällen ein organischer Körper durch wiederholte Annellierungen auf den höchst erreichbaren Reinheitsgrad gebracht werden, freilich unter Voraussetzung der Empfindlichkeit der schließlich verwendeten Kontrollmethoden.

Summary.

The evaporation of solutions of organic materials in volatile solvents leaves deposits in the form of rings. This phenomenon (annelation) may be employed for the purification of certain organic compounds.

If the solution of a compound, which contains a trace of a foreign material is evaporated, the latter will separate as a ring or part of a distinct concentric ring. Depending on the nature of the dissolved materials and the solvent employed, the concentration of the solutions, and the weight ratio of the foreign material to the principal compound, the ring may be peripheric, median or central.

Annelation may thus permit the detection of a trace of foreign material in a compound that is supposed to be pure, or, in certain cases, by successive annelations, an organic compound may be brought to the maximum possible degree of purity, taking due account of the sensitivity of the final testing techniques.

Bibliographie.

[1] *N. F. Ermolenko*, Journal russe de Chimie-Physique, **11**, 149 (1938); Journal russe de Chimie Générale, **9**, 965 (1939); **10**, N° 17, 1565 (1940); Bull. anal. **X**, N° 9, Réf. 10—60, 902 (1949).

Institut für anorganische und analytische Chemie der Technischen Hochschule in Wien.

Interessante Beispiele der angewandten Mikrochemie.

Von

R. Strebinger.

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

Durch meine langjährige Tätigkeit als Konsulent der Meisterschule für Konservierung und Technologie an der Akademie der bildenden Künste in Wien habe ich besonders auf diesem Spezialgebiet viele Erfahrungen sammeln können, da Professor *Eigenberger* einer der ersten war, der zur Ergründung verschiedener einschlägiger Probleme die mikroanalytische Untersuchungstechnik herangezogen hat. Ich möchte mich gleich dem ersten Beispiel zuwenden:

Die mikroanalytische Untersuchung des Großen Alchimisten-Medaillons Kaiser Leopold I.

Dieses im Besitz der Bundessammlung für Medaillen und Münzen, Kunsthistorisches Museum Wien, befindliche, angeblich aus unedlem Metall gefertigte Medaillon*, wurde von dem Alchimisten *Wenzel Seiler* seinem Gönner *Kaiser Leopold I.* zu dessen Namenstag 1677 als Geschenk verehrt und vor dem versammelten Kaiser samt Hofstaat, dem hohen Adel und der Geistlichkeit, von *Wenzel Seiler* durch teilweises Eintauchen in eine Flüssigkeit in Gold verwandelt. Das im Museum aufbewahrte Objekt zeigt auch tatsächlich bis zum Flüssigkeitsniveau goldgelbe Färbung, während der nicht eingetauchte Teil eine graue Färbung besitzt. Das Objekt wiegt zirka 8 kg und ist von hohem künstlerischem Wert. Es zeigt auf der einen Seite den Stammbaum des Kaiserhauses in 42 Brustbildern (Abb. 1). Die Rückseite weist folgende Inschrift auf: „Dem geheiligtsten, mächtigsten und unbesiegbarsten römischen Kaiser Leopold I., dem sorgfältigen Erforscher der Geheimnisse der Natur, widmet und bringt diese echte Probe wahrer und

* Mitteilungen der Numismatischen Gesellschaft in Wien, Bd. XVI.

vollkommener metallischer Umwandlung als geringes Denkzeichen des jährlichen Namensfestes usw. usw." Der angeblichen Fähigkeit *Wenzel Seilers*, aus unedlen Metallen Gold zu erzeugen, wurde damals um so mehr Glauben geschenkt, als es ihm vorher auch gelungen sein soll, aus Zinn und Kupfer der böhmischen Bergwerke Gold zu erzeugen.

Abb. 1. Medaillon Kaiser Leopold I.
Die Einkerbungen und Löcher stammen von einer früheren Untersuchung.

Es wurden aus diesem Gold sogar Münzen geschlagen mit der Inschrift: „Aus Wenzel Seilers Pulvermacht, bin ich aus Zinn zum Gold gemacht".

Es sollte nun geklärt werden, wie diese scheinbare Umwandlung von unedlem Metall in Gold zustande kam. Einer makroanalytischen Untersuchung stand bisnun die Kostbarkeit des Objektes entgegen, welches durch eine Probennahme nicht beschädigt werden durfte. Gemeinsam mit *W. Reif* habe ich nun — ohne das Medaillon zu beschädigen — an fünf verschiedenen Stellen etwa je 25 bis 30 mg Probematerial entnommen und qualitativ sowie quantitativ mikroanalytisch untersucht.

Qualitativ konnten wir feststellen: Gold, Silber, Kupfer, Zinn, Zink und Eisen. Quantitativ erhielten wir die nachstehenden Analysenzahlen:

I.	III.	IV.	V.
43,95% Ag	42,04% Ag	44,20% Ag	43,31% Ag
46,98% Au	49,04% Au	46,75% Au	47,45% Au
7,66% Cu	7,21% Cu	7,92% Cu	7,45% Cu
			1,24% Sn
98,59%	98,29%	98,87%	99,45%
Rest: Sn (Zn, Fe)	Rest: Sn (Zn, Fe)	Rest: Sn (Zn, Fe)	Rest: (Zn, Fe)

II. wurde nur qualitativ analysiert.

Außerdem wurde mit einem Mikropyknometer die Dichte mit 14,25 ermittelt. Eine frühere Makro-Dichtebestimmung (im Jahre 1876) hat nur eine Dichte von 12,67 ergeben.

Wir haben nun auf Grund der gewonnenen Analysenzahlen im Hauptmünzamt eine Legierung in Blechform herstellen lassen und mit dieser Versuchslegierung zahlreiche Tauchversuche in Säuren und Salzlösungen verschiedener Konzentration vorgenommen. Die Versuchslegierung ist im Farbton vollkommen identisch mit dem nichtgetauchten Teil des Medaillons und verfärbt sich nach Einbringen in kalte Salpetersäure 1 : 1 bis zum Niveau der Flüssigkeit deutlich goldgelb. Nach dem Abspülen, Trocknen und Reiben der Oberfläche mit einem Wollappen zeigt der getauchte Teil wirklich täuschend die Farbe einer Goldlegierung von hohem Feingehalt.

Untersuchung der Signaturreste eines Gemäldes.

Dieses dem Maler *Vermeer Van Delft* zugeschriebene Bild wurde nach gründlicher Reinigung von allen Übermalungen mir übergeben, um aus den Resten der vorhandenen Signatur die Zusammensetzung der verwendeten Farbe festzustellen. Ich konnte von der Signatur, die sich am Buchdeckel befindet, natürlich wegen des ungeheuren Wertes dieser Signaturreste nur ganz wenig entnehmen. Diese Untersuchung war für mich die Mikroanalyse, welche ich mit der kleinsten mir zur Verfügung stehenden Substanzmenge qualitativ bisher durchgeführt habe. Die wenigen, einzeln abgeschabten Teile, welche von mir und dem Chefrestaurator des Kunsthistorischen Museums, Professor *Hajsinek*, entnommen wurden, konnte ich eigentlich genau nur mit Hilfe der Lupe erkennen. Das Signum ist in dünner, brauner Lasurfarbe aufgetragen und die Jahreszahl 1667 deutlich rekonstruierbar. Ich konnte eindeutig feststellen, daß die verwendete Farbe identisch ist mit einer Farbe des gleichen Farbtones an der Baumrinde des Gemäldes. Gefunden habe ich Mangan, Blei, Eisen und — vielleicht als das Interessanteste — Sulfid. Dieses Sulfid, nachgewiesen mit Hilfe der Jodazidreaktion, ist

nur durch Bildung von Bleisulfid erklärlich, das sich aus einer Bleiverbindung im Laufe der Jahrhunderte gebildet hat. Die verwendete Bleiverbindung ist entweder auf ein Aufhellen der angewandten

Abb. 2. Vermeer van Delft.
Signaturreste am Buchdeckel.

braunen Farbe mit Bleiweiß oder aber auf die Verwendung eines bleihaltigen Sikkativs zurückzuführen. Jedenfalls ist die Farbe der Signatur identisch mit der Farbe der Baumrinde und sicher zur Zeit *Vermeers* aufgetragen worden (Abb. 2 und Abb. 3).

Feststellungen der Vorgänge, welche Ausblühungen an einem gotischen Tafelbild bedingten.

An diesem Tafelbild zeigten sich nach einer Lagerung in einem Bergungsraum runde, graue, kraterähnliche Ausblühungen bis zum Durchmesser von 1 mm, diese Ausblühungen waren spröde und porös. Es sollte die Ursache dieser Ausblühungen ergründet werden. Auch hier wurde das Probematerial im Verein mit Professor *Hajsinek* vom Kunsthistorischen Museum in Wien, durch vorsichtiges Abschaben unter der Lupe, ohne die Farbpigmentschicht zu verletzen, entnommen.

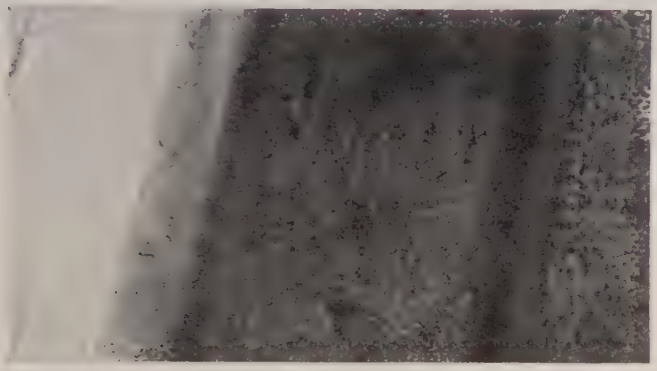


Abb. 3. Signaturreste.

Die anorganische Mikroanalyse ergab einwandfrei das Vorhandensein von Calcium, Kohlensäure, Zink und Natrium, andere Schwermetalle waren nicht vorhanden.

An organischen Bestandteilen war ein wachsähnlicher Körper, nach dem Mikroschmelzpunkt vermutlich Bienenwachs, nachweisbar. Auffallend war bei der mikroskopischen Untersuchung der in Glyzerin aufgeweichten verteilten Untersuchungsprobe das Vorhandensein von Resten abgestorbener lebender Zellen. Ich habe daher Anteile der Probe der mikrobiologischen Versuchsanstalt der Hochschule für Bodenkultur (Professor *Szilvinyi*) übergeben und um einen mikroskopisch-biologischen Untersuchungsbefund gebeten.

Bei der vorgenommenen Untersuchung konnten fast rein zwei Pilzarten festgestellt werden, und zwar ein Dematium species und ein Cytromyces, typische Kellerschimmelpilze, die zu ihrem Gedeihen großer Feuchtigkeit bedürfen. Das von mir festgestellte Vorkommen von Zink erklärt sich aus der interessanten Tatsache, daß bei diesem gotischen Tafelbild als Grundierung respektive als Bolus Zinkoxyd in Verwendung genommen wurde, wie es sonst nur manchmal bei gotischen Plastiken von Faßmalern dieser Zeit verwendet wurde. Durch die

Feuchtigkeit des Lagerraumes wurde das Wachstum der Schimmelpilze, deren erste Nahrung wohl im Honig des technischen Bienenwachses zu suchen ist, weitestgehend gefördert und durch diesen Wachstumsprozeß aus der Grund- bzw. Bolusschicht Leimsubstanz als

Abb. 4. Ausblühungen an einem Tafelbild.

Nahrungsmittel durch die Craquelures angesaugt, wodurch auch in den Ausblühungen das Vorhandensein von Zink- und Calciumverbindungen, die in größerer Menge nachgewiesen werden konnten, seine Erklärung findet. Es ist demnach die Ursache dieser Ausblühungen in einer unsachgemäßen Lagerung des Bildes zu suchen (Abb. 4).

Untersuchung von lanzettförmigen Gaseinschlüssen im Fensterglas.

Nun noch eine Mikrountersuchung aus der technischen Praxis: Bei der Erzeugung von Fensterglas ergaben sich lanzettförmige Bläschen,

gefüllt mit einem grauweißen, feinen Belag. Durch Aufschneiden dieser Bläschen und durch Einbringen von verschiedenen Reagenzien unter Evakuieren konnte eindeutig Natrium als Natriumuranylacetat und Sulfat als Calciumsulfat mikrochemisch nachgewiesen werden. Blindproben am Glas selbst verliefen negativ. Auf Grund dieses Ergebnisses der qualitativen Mikroanalyse wurde der Fabrikationsprozeß entsprechend geändert und dadurch Abhilfe geschaffen.

Zusammenfassung.

An einem überaus wertvollen, künstlerisch gearbeiteten Medaillon wurde mittels qualitativer und quantitativer Mikroanalysen das Problem der angeblich von dem Alchimisten *Wenzel* Seiler vorgenommenen Umwandlung des aus unedlem Metall gegossenen Medaillons in Gold geklärt.

Die Signaturreste eines *Vermeer van Delft* zugeschriebenen Bildes wurden durch mikroanalytische Untersuchung einer nur durch die Lupe sichtbaren Menge als aus derselben Zeit wie das Gemälde stammend erkannt.

Nach einer durchgeführten Restaurierung zeigten sich an einem auf Holz gemalten Meisterwerk nach längerer Zeit schwere Schäden, deren Ursache zufolge mikroanalytischer Untersuchung nicht in der Restaurierung, sondern in unsachgemäßer Lagerung in einem Bergungskeller zu suchen ist.

Die Ergebnisse der mikrochemischen Untersuchung von Einschlüssen bei der Erzeugung von Fensterglas führten nach entsprechender Änderung im Fabrikationsprozeß zur Behebung dieser Fabrikationsfehler.

Summary.

The problem of the reputed transmutation into gold by the alchemist *Wenzel Seiler* of a medallion which allegedly had been cast from base metal was cleared up by qualitative and quantitative microanalyses carried out on an extremly valuable, artistically worked medallion.

The remains of the signature on a picture ascribed to *Vermeer van Delft* was found to come from the same period as the picture itself. The microanalytical examination was conducted on an amount of material which could be seen only under a magnifying glass.

Quite a while after being restored, serious damage became apparent in a masterpiece painted on wood. Microanalytical study showed that the fault was not in the restoration but in unwise storage in a salvage cellar.

Microchemical study of inclusions during the manufacture of window glass, led to appropriate changes in the manufacturing process which resulted in the elimination of this trouble.

Résumé.

A l'aide de microanalyses quantitatives et qualitatives sur un médaillon d'une très grande valeur, artistiquement travaillé, on a éclairci le problème

de la prétendue transformation en or effectuée par l'alchimiste *Wenzel Seiler* de ce médaillon coulé en métal commun.

Des restes d'une signature d'un tableau attribué à *Vermeer van Delft* furent reconnus, à l'aide d'une recherche microanalytique sur une quantité visible seulement à la loupe, comme étant de la même époque que le tableau.

Après une restauration, de grands dommages sont apparus sur un tableau de maître peint sur bois dont on trouva l'origine à l'aide d'une recherche microanalytique, non pas dans l'effet de la restauration, mais dans les mauvaises conditions d'entrepôt dans une cave-abri.

Les résultats de l'étude microchimique des inclusions lors de la production du verre à vitre conduisirent, après une modification convenable du procédé de fabrication, à l'élimination de ces défauts de fabrication.

Laboratorium der Edelstahlwerke der Gebrüder Böhler & Co A. G., Kapfenberg.

Mikrochemie im Dienste des Eisenhütten- und Stahlwerkchemikers.

Von

K. Swoboda.

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 21. August 1950.)

Bei Sichtung der einschlägigen Literatur kann man ersehen, daß schon seit Jahren bei so mancher Makromethode des Eisenhütten- bzw. Stahlwerkchemikers die Ergebnisse der Forschungen der Mikrochemie eingebaut sind bzw. mitverwendet werden. Diese Makro-Mikro-Methoden werden als Semi- oder Halbmikro-Methoden bezeichnet. Darüber hinaus hat aber auch der Eisenhüttenchemiker späterhin reine Mikromethoden entwickelt. Es wird ihm vielfach der Vorwurf gemacht, daß er verhältnismäßig spät zur Mikrochemie gestoßen ist. Dies ist dadurch erklärlich, daß dem Hüttenchemiker hochentwickelte Verfahren zur Verfügung stehen, die meist auch sehr rasch durchführbar sind, wobei die einzelnen Elemente meist aus gesonderter Einwaage und ohne umständliche Trennungen zuverlässig ermittelt werden können. Bei einem solchen Stand der Dinge kann die Mikroanalytik mit der üblichen Stahlanalytik nicht in Wettbewerb treten, sofern genügend Probegut zur Verfügung steht, was fast immer der Fall ist.

Die Mikroanalytik ist hingegen immer am Platze, wenn Mangel an Probematerial herrscht, wenn dem fertigen Werkstück nur einige Feilspäne entnommen werden können, zur Untersuchung veränderter Stellen gebrauchter Werkstücke, für Oberflächenuntersuchungen (bei Nitrierungen, Zementierungen), für Schichtenuntersuchung bei Zunderbildung und bei Schweißnähten, zur Untersuchung von groben Einschlüssen aus feuerfesten Stoffen oder Schlacken, zur Untersuchung isolierter Einschlüsse (Oxyde, Sulfide, Nitride, Karbide) und Korngrenzenbestandteilen.

Der Anwendungsbereich kann noch erheblich erweitert werden und erstreckt sich fast auf alle Gebiete der metallurgischen Forschung. Tritt man an die Entwicklung einer Mikromethode heran, so ist es naheliegend, sich an die entsprechende Makromethode anzulehnen, und, entsprechend der geringeren Einwaage, die anzuwendenden Reagenzien geringer, die erforderlichen Gefäße und Apparate kleiner zu bemessen und gegebenenfalls auch zweckmäßiger zu konstruieren.

Eine so einfache Übertragung, ein Kopieren mit Verkleinerungslupe, ist jedoch nicht immer möglich, weil sich mikrochemisch Einflüsse bemerkbar machen, die stark ins Gewicht fallen, die aber makrochemisch ohne Bedeutung sind, da sie die Blindprobe kaum oder nur in erträglichem Maße beeinflussen.

Im Laufe der Jahre sind, wie schon erwähnt, eine Reihe von Mikroverfahren von Eisenhüttenchemikern ausgearbeitet worden.

Klinger, Koch und *Blaschczyk* veröffentlichten 1940[1] Mikroanalytische Prüfverfahren zur Untersuchung von Eisen und Stahl. Bestimmung von Kohlenstoff, Eisen, Silicium, Mangan, Phosphor, Schwefel, Aluminium, Stickstoff, Chrom, Nickel, Molybdän, Wolfram, Titan, Vanadin und ihre Trennung. Auf eine nähere Besprechung dieser Verfahren kann in diesem Rahmen nicht eingegangen werden. Es ist aber festzustellen, daß deren überwigende Mehrheit photometrische Verfahren sind. Diese werden vom Eisenhüttenchemiker ganz besonders bevorzugt. Dann folgen im weiteren Abstand gravimetrische, im geringeren Ausmaße maßanalytische und vereinzelt elektrolytische und polarographische Verfahren. Bei den maßanalytischen Verfahren fällt auf, daß der Eisenhüttenmikrochemiker den manganometrischen Methoden aus dem Wege geht.

Ich möchte heraushebend auf einige Verfahren näher eingehen, und zwar auf Verfahren zur Bestimmung von C, S, Ta und Nb, die in eigener Werkstatt eine besonders pflegliche Behandlung erfahren haben und zum Teil nicht veröffentlicht sind.

Kohlenstoffbestimmung.

Die C-Bestimmung erfolgt durch Verbrennung im Sauerstoffstrom. Die gebildete Kohlensäure wird in Absorptionsmitteln absorbiert und entweder gravimetrisch oder gasvolumetrisch bestimmt.

Für die gravimetrische Mikro- oder Halbmikro-C-Bestimmung wurde ursprünglich eine Apparatur verwendet, die im Aufbau der des Makroverfahrens entsprach, nur daß sie geringere Abmessungen aufwies. Diese Apparatur hatte Mängel und mußte abgeändert werden. Die endgültig entwickelte Apparatur (Abb. 1) besteht aus folgenden Teilen:

1. Sauerstoffflasche mit Druckminderventil.

2. Reinigungsvorlage für den Sauerstoff, bestehend aus zwei Waschflaschen üblicher Größe, die erste mit Chromschwefelsäure, die zweite mit konz. Schwefelsäure gefüllt, einem U-Rohr mit Natronasbest, einem U-Rohr mit Magnesiumperchlorat und einem Überdruckausgleichsgefäß *D*.

3. Einschiebevorrichtung, bestehend aus einem T-Rohr *E* und dem Schieber *S* aus Quarz, der mit Hilfe eines dicht schließenden Gummischlauches mit dem T-Stück verbunden ist. Der Schieber muß entsprechend lang sein, so daß man das Schiffchen in den Verbrennungsraum, bis in die Mitte des Verbrennungsrohres vorschieben kann. Das

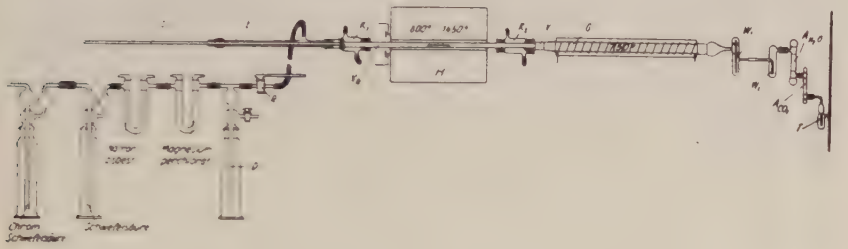


Abb. 1. Apparatur zur Mikrobestimmung von Kohlenstoff.

T-Rohr wird mit Gummistopfen und einer Verlängerung des Kühlers H_1 mit dem Verbrennungsrohr *Vr* verbunden.

4. Widerstandsofen *H* mit Verbrennungsrohr *Vr*. Der Widerstandsofen ist mit Silitheizstäben ausgestattet. Seine Temperatur kann mit Hilfe eines Widerstandes zwischen 800 bis 1450° reguliert werden.

Das Verbrennungsrohr *Vr*, 500 mm lang, 10 mm lichte Weite, 2 mm Wandstärke ist aus hochfeuerfestem Porzellan. Seine Enden sind mit zwei Wasserkühlern K_1 und K_2 aus Quarz versehen, die mittels Asbest und Gummistopfen auf dem Verbrennungsrohr befestigt sind. Das Verbrennungsrohr *Vr* ist (über einen Vorstoß *V*) durch Schliff gasdicht mit dem Quarzrohr des anschließenden Kupferoxydrohrofens *G* verbunden.

5. Kupferoxydrohrofen *G*, bestehend aus einem mit Kupferoxyd gefüllten Quarzrohr auf das eine Wicklung aus Cekasdraht aufgebracht ist. Die Temperatur wird konstant auf 700° gehalten. Die Maße des Quarzrohres sind: 500 mm Länge (einschließlich Schliffe) und 10 mm innerer Durchmesser. Die Schlifflänge beträgt ungefähr 50 mm.

6. Die Absorptionsvorlage, bestehend aus zwei Waschfläschchen W_1 und W_2, zwei Absorptionsröhrchen A_{H_2O} und A_{CO_2} und einem Blasenzähler. Das erste Waschfläschchen W_1 ist gefüllt mit 2 bis 3 ml Chromschwefelsäure, das zweite W_2 mit 2 bis 3 ml konz. Schwefelsäure.

Sie sind untereinander und mit dem Quarzrohr durch Schliffe verbunden. Das erste Absorptionsröhrchen ist gefüllt mit P_2O_5 und das zweite mit Natriumasbest und Magnesiumperchlorat (wasserfrei) und der Blasenzähler mit Schwefelsäure. Absorptionsröhrchen und Blasenzähler sind untereinander und mit dem zweiten Waschfläschchen durch Gummischläuche verbunden.

Als Absorptionsröhrchen A_{CO_2} sind zwei verschiedene Muster vorgesehen. Das größere Röhrchen hat eine Länge von 80 mm und einen Durchmesser von 16 mm und wiegt gefüllt etwa 20 g. Das kleinere Röhrchen hat eine Länge von 40 mm und etwa 4 mm lichte Weite und wiegt gefüllt 4 bis 6 g.

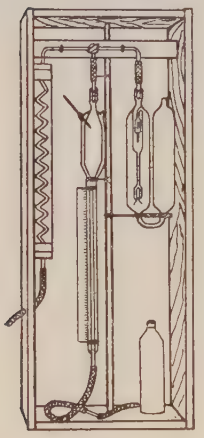


Abb. 2. Apparatur zur gasvolumetrischen Kohlenstoffbestimmung.

Die Arbeitsweise nach diesem Mikro- bzw. Halbmikroverfahren nimmt mehr als zwei Stunden in Anspruch. Es liefert einwandfreie, in vielen Fällen aber genauere C-Werte als das übliche gewichtsanalytische Verbrennungsverfahren mit höherer Einwaage, wird aber nur dann empfohlen, wenn die üblichen Verfahren aus Materialmangel überhaupt nicht oder nicht mehr mit der genügenden Genauigkeit ausgeführt werden können.

Eine Ausnahme hingegen wird gemacht für die Untersuchung geringer C-Gehalte (unter 0,1%), vor allem bei schwer verbrennlichen Substanzen wie Fe-Cr, hochprozentigen Cr- und Cr-Ni-Stählen.

Je nach dem zu erwartenden C-Gehalt betragen die Einwaagen bei diesem Verfahren 10 bis 500 mg (bei Fe-Cr und Stählen mit C-Gehalten in der Größenordnung 0,05% kann die Einwaage bis auf 1 g steigen).

Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die lange Analysendauer. In dieser Richtung ist der Eisenhüttenchemiker verwöhnt. Er verwendet für die C-Bestimmung fast ausnahmslos eine volumetrische Methode und ist damit leicht in der Lage, den Kohlenstoff in 5 Min. zu ermitteln. Die Genauigkeit der Bestimmung beträgt bei 1 g Einwaage bis zu 1% $\pm$ 0,01% C wie bei der gewichtsanalytischen Makrobestimmung. Bei den vorerwähnten Stoffen jedoch ist diese Genauigkeit zu gering. In der letzten Zeit kommt das weiche Fe-Cr in vier verschiedenen C-Lagen in den Handel, und zwar Fe-Cr mit 0,10%, mit 0,08%, mit 0,06% und mit 0,03% C. Um die Korngrenzenkorrosion bei den korrosionsfesten Stählen, den $^{18}/_{8}$-Stählen mit etwa 0,1% C zu verhüten, ist die Zulegierung von z. B. Ti, Ta und Nb notwendig, und zwar in Mengen, die ein Vielfaches des vorhandenen C-Gehaltes betragen. Dieses Vielfache beträgt für Ti 5, für Ta 13, für Nb 7. Bei fehlender Zusatzlegierung

muß der C-Gehalt 0,03% oder weniger betragen. In allen diesen Fällen kommt es auf eine sehr genaue C-Bestimmung an.

Bei dem geschilderten gravimetrischen Mikroverfahren wird eine Genauigkeit von ± 0,002% erreicht. Die gleiche Genauigkeit kann aber auch auf gasvolumetrischem Wege erzielt werden, und zwar in 5 Min.

Die gasvolumetrische Mikro- und Halbmikro-C-Bestimmung.

Die Apparatur zur gasvolumetrischen C-Bestimmung (Abb. 2) besteht aus einem Kühler, einer mit Niveauflasche versehenen Meßbürette für C-Gehalte bis 1,5% bei 1 g Einwaage, die im oberen Teil erweitert und mit entsprechender Menge Sperrflüssigkeit gefüllt ist, und einer mit Kalilauge gefüllten Absorptionspipette. Die Verbindung zwischen Kühler bzw. Verbrennungsrohr und Meßbürette einerseits und zwischen Meßbürette und Absorptionspipette anderseits wird mit Hilfe eines Dreiweghahnes hergestellt. Absorptionspipette und Meßbürette besitzen je ein Rückschlagventil, um den Eintritt der Kalilauge in die Meßbürette bzw. den Eintritt der Sperrflüssigkeit in die Absorptionspipette zu verhindern.

Die Meßbürette ist mit einer verschiebbaren Skala ausgestattet, auf der die Prozente Kohlenstoff abzulesen sind. Diese Werte müssen entsprechend dem herrschenden Barometerstand und der herrschenden Temperatur korrigiert werden. Die Korrektionsfaktoren werden einer Tabelle entnommen.

Wenn Bestimmungen stark verschiedener C-Gehalte aufeinanderfolgen, kann die Sperrflüssigkeit CO_2 abgeben oder aufnehmen, was zu fehlerhaften Resultaten führt. Gegebenenfalls empfiehlt sich für hohe und niedrige C-Gehalte die Verwendung von zwei verschiedenen Apparaturen oder des Mehrfach-C-Bestimmungs-Apparates, der von A. *Eder* zusammen mit der Firma Gebrüder Klees, Düsseldorf entwickelt wurde. Dieser Apparat (Abb. 3) enthält außer der üblichen Bürette für C-Gehalte bis 1,5% C, noch eine Bürette für C-Gehalte bis 0,25% C und eventuell noch eine Bürette für sehr hohe C-Gehalte bis 4,5% C (Dreifach-C-Bestimmungs-Apparat). Eine Besonderheit dieser Apparatur ist die Zusatzbürette, die Umlaufkühlung und die Ventilflasche. Jede Meßbürette ist nämlich mit einer Zusatzbürette mit Niveaufläschchen verbunden, deren Kühlflüssigkeit zugleich Sperr- und Kühlflüssigkeit der Meßbürette ist. Die dadurch ermöglichte Umlaufkühlung sichert Temperaturkonstanz. Die Zusatzbürette oder Faktorbürette hat eine Skala mit Korrektionsfaktoren. Zur Einstellung des Faktors stellt man den der Tabelle entnommenen Faktor mit Hilfe des verschiebbaren Niveaufläschchens an der Teilung der Zusatzbürette bei geöffnetem Hahn ein, hierauf schließt man den Hahn. Bei Temperatur- und Druckschwankungen ergibt sich eine Niveaudifferenz. Nach Aus-

gleich derselben mit dem Niveaufläschchen kann der richtige Faktor abgelesen werden.

Die Ventilflasche hat den Zweck, wenn nicht rechtzeitig die Sauerstoffzufuhr in die Meßbürette durch Betätigung des Dreiweghahnes abgestellt wird, zu verhindern, daß die Verbrennungsgase durch die Niveauflasche perlen können, also das Durchgehen zu vermeiden. Die Niveauflasche wird während der Verbrennung mit Hilfe des verschiebbaren Halters in eine solche Höhe gestellt, daß am Ende der Verbren-

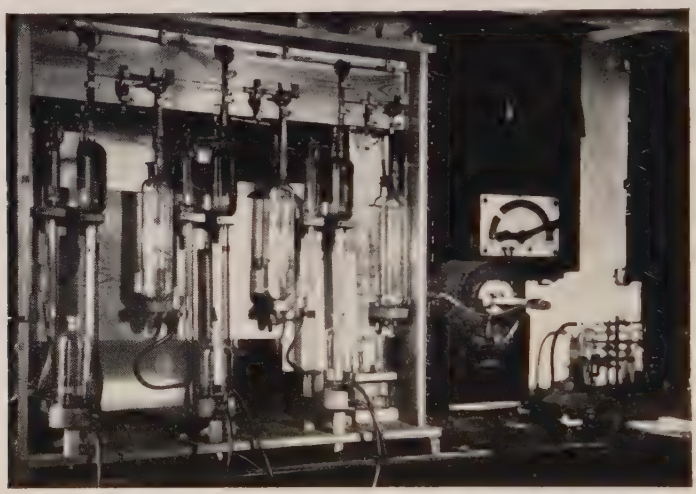


Abb. 3. Dreifach-C-Bestimmungsapparat.

nung der Flüssigkeitsspiegel von der Niveauflasche gegenüber der Meßbürette etwa 5 cm höher steht. Der Sauerstoff strömt zuerst durch die Waschflasche (mit Kalilauge gefüllt) an der Ventilflasche vorbei durch den Ofen und dann in die Meßbürette. Ist diese schließlich mit dem CO_2-O_2-Gemisch bis zur einzustellenden Nullmarke gefüllt, wird infolge des kleinen Überdruckes in der Bürette automatisch ein Ventil ausgelöst und der weiter nachströmende Sauerstoff perlt vor dem Ofen durch die Ventilflasche, welche mit Wasser in etwa 5 cm Schichthöhe gefüllt ist, ins Freie.

Bei dieser Apparatur interessiert aber vor allem den Eisenhütten-Mikrochemiker die kleine Bürette für C-Gehalte bis 0,25%, die ich als Mikrobürette bezeichnen möchte. Die Normalbürette für C-Gehalte bis 1,5% ist so geeicht, daß bei 760 mm Barometerstand, bei einer Temperatur von 16° C und bei einer Meßhöhe von 30 cm das Volumen 30 ml beträgt. 1 ml hat dann eine Meßhöhe von 1 cm und entspricht 0,05% C bei 1 g Einwaage. Bei der Mikrobürette ist die Meßhöhe 25 cm und das

Volumen 5 ml, 1 ml hat dann eine Meßhöhe von 5 cm, wodurch die Ablesegenauigkeit gegenüber der Normalbürette eine 5fach größere ist. Es ist nun mit dieser Mikrobürette möglich, gasvolumetrisch die gleiche Analysengenauigkeit von $\pm 0{,}002\%$ zu erzielen wie bei der gravimetrischen Mikro-C-Bestimmung. Durch Verkleinerung des Volumens der Mikrobürette bei gleicher Meßhöhe kann man die Analysengenauigkeit erhöhen oder die Einwaage verringern. Der Vorteil der gasvolumetrischen Bestimmung gegenüber der gravimetrischen besteht in der kurzen Analysendauer, der einfacheren Handhabung der Apparatur und im Wegfall der Mikrowaage.

Schwefelbestimmung.

Für die S-Bestimmung kommen makro- und mikroanalytisch das Verbrennungsverfahren und das Entwicklungsverfahren in Betracht.

Beim Makroverbrennungsverfahren wird 1 g der Probe in trockenem Sauerstoffstrom bei 1200 bis 1450°, je nach Verbrennlichkeit, verbrannt. Das gebildete SO_2 wird nach *Holthaus* in nachträglich verbesserter Ausführungsweise in Wasserstoffperoxydlösung geleitet, zu Schwefelsäure oxydiert und diese mit n/40-Natronlauge unter Verwendung von Methylrot als Indikator titriert (1 ml n/40-NaOH = 0,04% S bei 1 g Einwaage). Ursprünglich hatte *Holthaus* mit n/10-Lösungen unter Verwendung von Methylorange gearbeitet (1 ml $^1/_{10}$-n-Maßflüssigkeit = 0,16% S bei 1 g Einwaage). In dieser Form war das Verbrennungsverfahren für das Edelstahlwerk, wo es sich in der Regel nur um S-Gehalte von 0,005 bis 0,04% S handelt, gänzlich ungeeignet.

Nach *Swoboda* wird daher das SO_2 mit neutraler Silbernitratlösung zu Ag_2SO_3 umgesetzt und die freiwerdende Salpetersäure mit $^1/_{200}$-n-Lauge titriert, Methylrot als Indikator. 1 ml $^1/_{200}$-n-Lauge = 0,008% S bei 1 g Einwaage.

Diese Methode wird in dem Buch „Analyse der Metalle", herausgegeben vom Chemikerfachausschuß der Gesellschaft „Metall und Erz", 1. Band, Schiedsverfahren, für die S-Bestimmung in verschiedenen Ferrolegierungen als Schiedsverfahren empfohlen und insbesondere für Ferro-Chrom als eine sehr genaue, einfache und schnelle Methode besonders hervorgehoben.

Diese Verfahren mit stark verd. Maßflüssigkeiten sind bereits Halbmikroverfahren. Sie werden zum Mikroverfahren durch Verringerung der Einwaage. Es ist jedoch im Hinblick auf die niedrigen S-Gehalte nicht zweckmäßig, mit der Einwaage unter 100 mg zu gehen.

Das Verbrennungsverfahren ließ sich also nur durch verringerte Einwaage und Verwendung einer Mikrobürette zur Mikromethode abändern. Anders liegen die Dinge beim Entwicklungsverfahren.

Bei der Makrobestimmung werden 5 oder 10 g in einem Entwicklungskolben von 1 l Inhalt in 100 ml konz. Salzsäure im Kohlensäurestrom gelöst und der gebildete Schwefelwasserstoff in 50 ml Zinkcadmiumacetatlösung (5 g Cadmiumacetat, 20 g Zinkacetat in 200 ml Wasser und 200 ml Eisessig gelöst, auf 1 l aufgefüllt und filtriert) geleitet. Das ausgefällte Cadmiumsulfid wird nach Zersetzung mit HCl mit etwa $^1/_{16}$-n-Jodlösung titriert. 1 ml J = 0,001 g S oder bei 10 g Einwaage 0,01% S.

Bei der Mikrobestimmung werden 100 mg des metallischen Stoffes oder eine kleinere Menge eines isolierten Sulfides in einem kleinen Rundkolben mit elektrolytisch entwickeltem Wasserstoff beschickt, unter Erwärmen in 5 ml Zinnchlorür-Salzsäure (1 g $SnCl_2$ in 100 ml HCl 1:1 gelöst) unter weiterem Durchleiten von Wasserstoff gelöst. Der gebildete Schwefelwasserstoff wird in 5 ml Cadmiumacetatlösung (1 g Cadmiumacetat, 1 ml Essigsäure in Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt) geleitet. Das ausgefällte Cadmiumsulfid wird auf ein Glasfilterröhrchen abfiltriert und mit Wasser gewaschen, der Niederschlag mit 1 ml einer genau eingestellten $^1/_{40}$-n-Jodlösung vom Sinter gelöst und die Lösung in einem 25-ml- oder 50-ml-Meßkolben (je nach S-Gehalt) aufgefangen und aufgefüllt. Die Lösung wird gegen Wasser photometriert. Die Differenz der Farbtiefe der ursprünglichen J-Lösung und der gemessenen ist dem S-Gehalt der Probe proportional. Die Messung erfolgt in einer 20- bis 50-mm-Küvette im violetten Licht der Quecksilberlampe mit dem Filter Hg 436.

$$c = 0{,}606\ (0{,}33 - K)\ \text{mg S /25 ml.}$$

Nach Lösung des Cadmiumsulfides in der J-Lösung kann das überschüssige J auch titrimetrisch zurückbestimmt werden. Zu diesem Zwecke verwendet man eine 5 ml fassende Mikrobürette mit 0,01-ml-Einteilung bzw. eine Wägebürette und titriert mit einer Thiosulfatlösung (1 ml = 0,2 mg S) unter Verwendung von Stärke als Indikator.

Das Entwicklungsverfahren ist nur bei unlegierten Stählen anwendbar und ist besonders zweckmäßig bei isolierten Sulfiden. Das Verbrennungsverfahren ist allgemeiner Anwendung fähig.

Die photometrische Bestimmung des Tantal und Niob.

Nach *Krivoschlykow* und *Platonow*[2] gibt Pyrogallol mit Niob, ebenso wie mit Tantal eine Gelbfärbung, die eine kolorimetrische Bestimmung dieser Metalle ermöglichen soll. Auf Grund dieser Angabe hat *A. Eder* im hiesigen Laboratorium die nachstehenden Arbeitsvorschriften, nach welchen Niob nur bei geringer Acidität, während Tantal fast ausschließlich nur bei höherer Konzentration färbt, für die Bedürfnisse des Edelstahlwerklaboratoriums ausgearbeitet.

Ein eingehenderer Bericht über diese Arbeiten ist einer späteren Veröffentlichung vorbehalten.

Das aus 2 g Einwaage durch wiederholte Umfällung und Reinigung erhaltene Erdsäuregemisch wird schließlich mit Kaliumbisulfat aufgeschlossen. Diese Schmelze dient zur Herstellung der Stammlösung. Sie wird in 50 ml 8%iger Weinsäurelösung in der Wärme (nicht kochen) gelöst, auf etwa 175 ml verdünnt, mit verdünntem Ammoniak (1 + 3) unter Verwendung von 5 Tropfen Phenolphthalein als Indikator, schwach alkalisch gemacht, mit $^1/_{10}$-n-Schwefelsäure neutralisiert und mit 10 ml $^1{}_{10}$-n-Schwefelsäure im Überschuß versetzt, in einen 200-ml-Meßkolben übergeführt und zur Marke aufgefüllt.

Zur Photometrierung von Niob.

5 ml Stammlösung in ein 50-ml-Becherglas pipettieren, bei 15 bis 20° mit 5 ml frisch bereiteter 1%iger Natriumsulfitlösung und 2,5 g Pyrogallol versetzen, durch leichtes Umschwenken in Lösung bringen, in einen 50-ml-Kolben überführen und zur Marke auffüllen. Nach 3 Min. Wartezeit in 2-cm-Küvetten mit der Nitralampe und Filter S 43 gegen eine leere Küvette im Vergleichsstrahlengang die Extiktion im *Pulfrich*-photometer messen.

Zur Photometrierung von Tantal.

5 ml der Stammlösung in ein trockenes 50-ml-Becherglas pipettieren, bei 15 bis 20° mit 5 ml schwefelsaurer Ammonoxalatlösung (31,5 ml Wasser und 1 ml Schwefelsäure, d = 1,84, mit Ammonoxalat gesättigt) und 1,2 g Pyrogallol versetzen, durch leichtes Umschwenken in Lösung bringen. Diese Lösung ohne Verdünnung in 2-cm-Küvetten der Photometrierung, wie bei Nb angegeben, zuführen.

Durch diese beiden Verfahren ist das Problem der Ta-Nb-Trennung wesentlich vereinfacht und gelöst. Diese Trennung war bisher schwierig und umständlich. Man hat es daher vielfach vorgezogen, aus dem gewogenen Pentoxydgemisch $Ta_2O_5 + Nb_2O_5$ die Summe Ta-Nb durch Anwendung eines Mischfaktors gemäß der Zusammensetzung der verwendeten Ta-Nb-Legierung zu errechnen, und konnte natürlich dann auch die Einzelelemente errechnen. Nachdem es möglich war, durch die vorbeschriebenen photometrischen Verfahren die Einzelelemente direkt zu bestimmen, hat sich aber durch Versuche herausgestellt, daß Ta und Nb in verschiedenem Maße verschlacken; und zwar ist der Abbrand bei Ta größer als bei Nb, so daß in der Schmelze eine Verarmung an Ta und eine Anreicherung an Nb eintritt. Die rechnerische Ermittlung der Einzelelemente aus der Summe ist daher nicht am Platze.

Die eingangs erwähnte Arbeit von *Klinger, Koch* und *Blaschezik*

skizziert den Stand der Technik auf dem Gebiet der Eisenhütten-Mikroanalytik bis Ende 1940.

Von den später erschienenen Veröffentlichungen möchte ich eine in allerletzter Zeit erschienene herausgreifen, da sie mir besonders bemerkenswert und bedeutsam erscheint.

W. Oelsen und *P. Göbbels*[2] berichten über „Versuche zur elektrolytisch-potentiometrischen Analyse". Dabei handelt es sich um eine potentiometrische Maßanalyse, bei der man das Titrationsmittel nicht von außen zugibt, sondern in der zu titrierenden Lösung elektrolytisch erzeugt. Es liegt hier die Umkehrung eines Vorganges vor, an dem die Chemiker bislang achtlos vorbeigegangen sind. Die gesetzliche Einheit der Stromstärke und damit die Eichung unserer Amperemeter beruht auf der in der Zeiteinheit elektrolytisch ausgeschiedenen Silbermenge. Die Umkehrung, d. h. die Anwendung der Elektrolyse und damit der Amperemeter zur quantitativen Messung chemischer Vorgänge über das *Faraday*sche Gesetz ist damit direkt nahegelegt. Auf diesem Prinzip beruhend, können Oxydations-, Reduktions- und Neutralisationsvorgänge quantitativ verfolgt bzw. gemessen werden. Es wird in der erwähnten Abhandlung mitgeteilt, daß Verfahren zur Bestimmung von Mangan, Chrom und Vanadin bereits entwickelt wurden. Die S-Bestimmung in Stählen nach dem neuartigen Verfahren in Anlehnung an das Verbrennungsverfahren nach *Holthaus* wird eingehend beschrieben. Bei der erforderlichen Apparatur hat lediglich das Absorptionsgefäß (Abb. 4), in welchem die gebildete Schwefelsäure durch Neutralisation mit Lauge ermittelt wird, eine Abänderung erfahren. Für die potentiometrische Endpunktbestimmung ist eine Platinelektrode (Indikatorelektrode) in das Absorptionsgefäß eingeschmolzen und an einem seitlichen Stutzen eine Umschlagelektrode angebracht. Die Elektrolysiervorrichtung ist einfach konstruiert. Ein Glasrohr, welches in das Absorptionsgefäß hineinragt, bildet den Anodenraum mit einem Diaphragma aus Filterpapier, gesättigter Kaliumsulfatlösung als Anodenflüssigkeit und einer Bogenlampenkohle als Anode. Um das Glasrohr ist im Kathodenraum eine Platinnetzelektrode als Kathode gelegt. Den

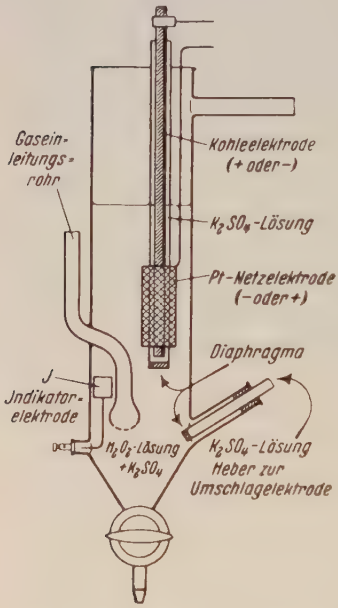


Abb. 4. Elektrolysiervorrichtung für die Schwefelbestimmung.

Elektrolysierstrom liefert ein Akkumulator mit etwa 4 V Spannung und entsprechendem einfachem Regelwiderstand. Der Auffangflüssigkeit aus sehr verd. Schwefelsäure und Wasserstoffperoxyd ist etwa ein Viertel ihrer Menge an gesättigter Kaliumsulfatlösung zugefügt, die bei der Elektrolyse an der Kathode das Alkali liefert.

Durch Einschalten des Elektrolysierstromes wird unter Durchleiten von Sauerstoff die Schwefelsäure der Auffangflüssigkeit neutralisiert. Die Stromstärke wird dabei mit Hilfe eines Widerstandes eines geeigneten Milliamperemeters auf einen bestimmten Wert einreguliert. Nunmehr wird die Probe verbrannt und nach 2 Min. (zur Austreibung der Kohlensäure) mit der elektrolytischen Neutralisation begonnen. Die Zeit der Elektrolyse wird mit der Stoppuhr gemessen, bis eben der Zeiger des Galvanometers der potentiometrischen Einrichtung wieder durch den Nullpunkt wandert.

Dieses elektrolytisch-potentiometrische Verfahren erscheint außerordentlich entwicklungsfähig. Es ist bestechend, mit der Stoppuhr in der Hand, die einzelnen Stoffe bestimmen zu können. Man kann bei diesem Verfahren mit kleinen Lösungsmengen, geringster Einwaage, und niedrigen Stromstärken arbeiten und zu höchst empfindlichen Messungen kommen. Es ist daher auch außerordentlich für mikroanalytische Untersuchungen geeignet.

Zusammenfassung.

Die beschriebene gravimetrische Mikro-Kohlenstoff-Bestimmung leistet dem Stahlwerkchemiker besonders wertvolle Dienste für die Untersuchung von Ferrochrom mit niedrigem Kohlenstoffgehalt (unter 0.10^0 %) und für rostsichere Stähle. Das Verfahren ergibt sehr genaue Resultate, hat aber den Nachteil langer Analysendauer. Gleiche Genauigkeit wird mit dem Apparat zur volumetrischen Kohlenstoff-Bestimmung erzielt, bei Anwendung einer Mikrobürette mit dem Vorteil kürzester Analysendauer (5 Minuten).

Für die Mikrobestimmung des Schwefels ist das entsprechend abgeänderte Entwicklungsverfahren nur für unlegierte Stähle anwendbar. Hingegen ist das Verbrennungsverfahren allgemeiner Anwendung fähig.

Ferner wird eine gesonderte photometrische Tantal- und Niob-Bestimmung in Stählen kurz beschrieben und darauf hingewiesen, daß die rechnerische Ermittlung der Einzelelemente aus der Summe der Pentoxyde unter Zugrundelegung der Analyse der verwendeten Tantal-Niob-Legierung abwegig ist, weil der Abbrand der beiden Elemente verschieden ist.

Schließlich wird noch die elektrolytisch-potentiometrische Analyse erwähnt, welche außerordentlich entwicklungsfähig ist.

Summary.

The gravimetric micro carbon determination described here renders particularly valuable service to the steel works chemist in the analysis of ferrochromes with low carbon content (below 0,10%) and stainless steels. The method gives very accurate results, but has the disadvantage of taking a long time. Equal accuracy is obtained with the apparatus for the volumetric determination of carbon, employing a microburette with the advantage of extremely brief analysis time (5 minutes). For the microdetermination of sulfur, the correspondingly modified evolution method as applicable only to non-alloyed steels. In contrast, the combustion method has general applicability.

A short description is given of a separate photometric method of determining tantalum and niobium in steels, and it is pointed out that the computed determination of the individual elements from the sum of the pentoxides on the basis of the analyses of the tantalum-niobium alloys employed, leads to error because the burning out loss is different for the two elements.

Finally mention is made of the electrolytic potentiometric analysis, which is capable of extraordinary development.

Résumé.

La microgravimétrie du carbone décrite ci-dessus rend des services particulièrement précieux aux chimistes dans l'industrie sidérurgique, pour les recherches sur les ferro-chromes à basse teneur en carbone (au-dessous de 0,10%) et pour les aciers inoxydables. Le procédé donne des résultats très exacts mais il présente le désavantage d'une plus grande durée d'analyse. On obtient la même exactitude à l'aide de l'appareil pour le dosage volumétrique du carbone par l'emploi d'une microburette avec l'avantage d'une durée d'analyse la plus rapide (5 minutes).

Pour le microdosage du soufre, on peut utiliser pour les aciers non alliés, un procédé modifié correspondant. Par contre, le procédé de combustion convient pour l'emploi général. On décrit en outre rapidement un procédé particulier pour le dosage photométrique du tantale et du colombium dans les aciers et par suite, on démontre que l'obtention, par le calcul, des éléments isolés à partir de la somme des pentoxydes, sur la base de l'analyse de l'alliage Ta-Nb utilisé, est fausse, parce que la pyrolyse des deux éléments est différente. Enfin, on mentionne l'analyse électrolytique-potentiométrique qui est extrêmement capable de développement.

Literatur.

[1] *P. Klinger, W. Koch* und *G. Blaschczyk*, Z. angew. Chem. **53**, 507 (1940).

[2] *N. F. Kriwoschlykow* und *M. S. Platonow*, Chimitscheski Shurnal Sser. B. Shurnal prikladnoi Chimii, **10**, 184 (1937); zitiert nach Chem. Zbl. **1937**, II, 2221.

[3] *W. Oelsen* und *P. Göbbels*, Stahl u. Eisen, **69**, 33 (1949).

Vereinigte Österreichische Eisen- und Stahlwerke Linz.

Bestimmung kleiner Prozentgehalte im Eisenhüttenlaboratorium.

Von

Th. Heczko.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

In einer Eisenhütte steht Analysenmaterial meist in beliebiger Menge zur Verfügung. Man muß aber seine Arbeit dem Umstand anpassen, daß oft nur Zehntel- bis Hundertstel Prozente zu bestimmen sind, wobei die Genauigkeit auf zwei Stellen anzustreben ist. Dies gilt vor allem für die alltäglichsten Bestimmungen, wie etwa von C, Mn, P, S. Das Arbeitstempo, oft nur auf Minuten befristet, erfordert Einwaagen, deren Größenordnung dem Üblichen entspricht, so daß die Menge der zu ermittelnden Elemente Milligramme oder auch noch weniger beträgt. So wird vielfach nach Verfahren gearbeitet, deren sich auch der Mikroanalytiker bedient:

Messung äquivalenter Gasvolumina; so des Kohlendioxyds bei der Kohlenstoffbestimmung in Stahl nach Verbrennung im Sauerstoffstrom.

Fällung als Niederschlag hohen Molekulargewichtes; so bei der Bestimmung von Phosphor mit Ammoniummolybdat, von Aluminium mit o-Oxychinolin.

Titration mit stark verdünnten Maßlösungen; so des Mangans nach Überführung in MnO_4' mit arseniger Säure, des Schwefels mit Lauge, nach Verbrennung im Sauerstoffstrom und Oxydation des SO_2 zu SO_4'', des gebundenen Stickstoffes in Stahl durch Lösen in Säure und im übrigen nach *Kjeldahl*.

Bei manchen Analysen stören beliebige Eisenüberschüsse nicht: so werden Chrom und Vanadin nach Überführung in die entsprechenden Säuren mit Eisensulfat potentiometriert.

Bei anderen Bestimmungen (Beryllium, gravimetrische Kontrolle von Aluminiumgehalten unter 0,1%, allgemeine Spurensuche im Stahl) ist zunächst die Hauptmenge des Eisens zu entfernen, durch Aus-

äthern der möglichst konzentrierten, oxydierten, salzsauren Lösung nach *Rothe*. Die Vorbereitung hierzu erfolgt ohne Einschleppen von Verunreinigungen durch Lösen des Stahls in Brom und Wasser und Einleiten erst von Chlorwasserstoffgas, dann von Chlor[1]. Bromwasser habe ich übrigens auch, als neutrales Lösungsmittel, zur Isolierung nichtmetallischer Einschlüsse in Stahl verwendet. Sie bleiben zurück, zusammen mit dem Kohlenstoff der Einwaage und kleinen Mengen organischer eisenhaltiger Verbindungen. Diese können mit Alkohol entfernt werden.

Von chromhaltigen Stählen bleiben auch die Karbide zurück. Deren Menge pflegt die oxydischen Einschlüsse weit zu überwiegen, so daß das Verfahren erfolgreiche Karbidforschung ermöglichte. Hinsichtlich der Einzelheiten verweise ich auf die betreffende Veröffentlichung[1].

Manche Gegenstände aus Stahl müssen ihre guten Festigkeitseigenschaften auch an Stellen behalten, die bei der Weiterverarbeitung vorübergehend stark erhitzt werden, wie dies beim Schweißen unvermeidlich ist. Sehr günstig wirken hier kleine Aluminiumzusätze. Ob die Ursache davon nur in der grundlegenden Änderung der Zusammensetzung der nichtmetallischen Einschlüsse liegt — sie bestehen sonst großenteils aus Eisen- und Manganoxyden —, oder ob auch dem zulegierten metallischen Aluminium eine Wirkung zukommt, ist zunächst eine Nebenfrage gegenüber der Aufgabe, das Aluminium in solchen Stählen auf das genaueste zu bestimmen und spätestens wenige Stunden nach dem Abstich das Ergebnis zu haben.

Insbesondere, als in den VÖEST solche Stahlqualitäten für neue Verwendungszwecke entwickelt wurden, erwiesen sich die sonst gebräuchlichen Analysenverfahren als viel zu umständlich und langwierig.

Als Retter in der Not sprang die Photometrie ein: Al gibt mit dem roten Farbstoff Eriochromcyanin einen dunkler roten, etwas anders getönten Lack. Vor der Bestimmung ist das Eisen abzutrennen. Die hierfür vorgeschlagene Elektrolyse an einer Quecksilberkathode[2] ist hierbei nicht notwendig: *A. Scuthe* und insbesondere sein Mitarbeiter *E. Schäfer* haben im Laboratorium des Dortmund-Hörder Hüttenvereins festgestellt, daß sich die Trennung einfach durch Fällung mit Alkalilauge bewerkstelligen läßt, ohne daß hierbei Adsorptionsreaktionen stören.

Das Rezept ist kurz folgendes: Die salzsaure, oxydierte Lösung von 1 g Stahl in einem 100-ml-Meßkolben wird nach Schütteln mit überschüssiger Lauge zur Marke aufgefüllt. Abfiltrierte 50 ml werden neutralisiert, mit einem Ammonium-Natrium-Acetat-Puffergemisch auf $p_H = 6$ gebracht, mit einer genau gemessenen Menge des Farbstoffes versetzt; dann füllt man auf 100 ml auf und photometriert mit dem Grünfilter.

Erschwerend ist die winzige Menge Aluminium in der Einwaage wegen dessen Allgegenwart in Reagenzien und Glasgefäßen. Durch sorgfältige Arbeit läßt sich aber die eingeschleppte Menge hinreichend konstant halten, und wir haben in Linz genügend Laboranten, die alle Feinheiten des Verfahrens beherrschen. So trägt auch das Laboratorium dazu bei, daß nun die VÖST den Stahl für die Druckrohrleitungen des Kapruner Wasserkraftwerkes in genügend guter und vor allem in immer gleichbleibender Qualität erzeugt.

Was die Analyse von Erzen betrifft, hat uns insbesondere die Bestimmung des Bleis Sorgen bereitet. Dieses Element findet sich in vielen Kiesabbränden, aber auch in manchen Siderit- und Limonitsorten, bis zu einigen Zehntel Prozent. Es verursacht Störungen im Hochofenbetrieb und verdampft großenteils beim Abstich als Oxyd, was mit Vergiftungsgefahr für die Ofenbelegschaft verbunden ist. Deshalb ist der Bleigehalt bei Erzlieferungsverträgen nach oben begrenzt und ist eine dauernde Analysenkontrolle der betreffenden Sendungen notwendig. Es ist dringend wünschenswert, in möglichst kurzer Zeit Resultate vorlegen zu können, damit der Betrieb rechtzeitig Maßnahmen treffen kann, damit z. B. ein Erzzug mit höherem als dem tolerierten Bleigehalt nicht entladen, sondern dem Verkäufer zurückgeschickt wird.

Bis vor einigen Monaten führten wir die Bleibestimmung gravimetrisch durch, mit 20 g Einwaage, gemäß folgendem Analysengang: Lösen in Salzsäure, nach Aufschluß des Unlöslichen Abtrennung des Eisens von den anderen Schwermetallen mit Schwefelwasserstoff, Lösen der Sulfide und Wiederholung der Trennung, schließlich Abscheidung des Bleies als Sulfat, Trennung desselben von anderen in Schwefelsäure unlöslichen Substanzen mit Ammoniumacetat und Fällung als Chromat. Wir haben uns mit dieser Bestimmung viel geplagt und wenig Dank gehabt; denn man muß dabei mit zwei Tagen Arbeitszeit rechnen, und die Ergebnisse waren meist von den Betriebsereignissen überholt.

Auch hier hat uns das Photometer geholfen: *H. Müller*[4] hat, fußend auf Arbeiten von *H. Fischer* und *G. Leopoldi*, ein Verfahren zur Bestimmung von Blei in menschlichen und tierischen Leichenteilen und ebensolchen Ausscheidungen geschaffen.

Es beruht auf der Anwendung von Diphenylthiokarbazon, kurz Dithizon genannt. Diese Verbindung löst sich in Tetrachlorkohlenstoff mit grüner Farbe. Beim Schütteln dieser Lösung mit wäßriger Lösung vieler Metallionen gehen diese in die organische Phase, unter Bildung sehr auffallend gefärbter Metallverbindungen des Dithizons. Das überschüssige freie Dithizon läßt sich durch Ausschütteln mit alkalischen wäßrigen Lösungen entfernen.

Bei Gegenwart von Cyanion läßt sich nur Pb, Bi, Sn(2) und Tl in beschriebener Weise ausschütteln. Sn läßt sich, falls zugegen, durch

Eindampfen der salzsauren Lösung nach Chloratzusatz verflüchtigen, Bi in Eisenerzen macht stets nur einen so kleinen Bruchteil des vorhandenen Pb aus, daß es nicht berücksichtigt werden muß, dasselbe gilt für Tl. Die Löslichkeit der Metalldithizonate in Tetrachlorkohlenstoff ist gering. Dieser Umstand zwingt zur Verwendung kleiner Substanzmengen.

Auf Grund dieses Sachverhaltes wurde in der Versuchsanstalt der VÖEST von *F. Neuwirth, Th. Heczko* und *F. Baumgartner* eine Bleibestimmung in Erzen ausgearbeitet, welche die Bewältigung von sechs Analysen in drei Stunden gewährleistet. Einzelheiten sind einer besoderen Veröffentlichung vorbehalten. So gebe ich einen Überblick:

1 g Erz wird in Salzsäure gelöst, die Lösung wird nach Zusatz von Kaliumchlorat auf ein kleines Volumen eingedampft. Der abfiltrierte unlösliche Rückstand wird nach Behandlung mit Flußsäure-Schwefelsäure in Salzsäure gelöst, die Lösung mit dem Filtrat vereinigt. Dann verdünnt man auf 1 l, und entnimmt 10 ml, entsprechend 0,01 g Einwaage, zur eigentlichen Analyse; sie schließt sich eng an die Vorschrift von *H. Müller* an: man versetzt hintereinander mit Zitronensäure, Kaliumcyanid und Hydroxylaminchlorhydrat, neutralisiert mit Ammoniak auf $p_H = 8$ bis 9 mit Hilfe von Thymolblau, schüttelt mit der Dithizonlösung aus, entfernt das nicht an Pb gebundene Dithizon durch Ausschütteln mit Kaliumcyanidlösung und photometriert die rote Lösung des reinen Bleidithizonates mit dem Grünfilter.

Auch bei der Bleibestimmung sind erhebliche Leerwerte zu berücksichtigen und Dithizon ist lichtempfindlich, schon durch Luftsauerstoff oxydabel. Trotzdem hat sich das Verfahren betriebssicher gestalten lassen, auch in der Hand von Hilfslaboranten: die Exstiktionslinie ist innerhalb der photometrischen Ablesefehler eine Gerade, ein mathematischer Beweis für die Zuverlässigkeit der Methode.

Ich erwähne gerne, daß Herr *Schmerlaib*, Student an der Grazer Universität, uns bei der Anpassung der Methode an Betriebsverhältnisse anläßlich einer Ferialpraxis wertvolle Dienste geleistet hat.

Dithizon wird pro Bestimmung nur milligrammweise gebraucht, der Tetrachlorkohlenstoff läßt sich durch Destillation wieder zurückgewinnen. Somit ist das Verfahren auch sehr billig, die gravimetrische Analyse kostet etwa siebenmal mehr.

Wir bestimmen auch noch andere Elemente photometrisch: Kupfer in Eisen und Eisenerzen mit Hilfe von Ammoniak, Molybdän in Stahl durch die Rotfärbung mit Rhodanid nach Zusatz von Zinnchlorür zur Stahllösung.

Erwähnenswert ist noch unsere Titanbestimmung in Eisen und Erzen mit Wasserstoffperoxyd, die von *F. Baumgartner* ausgearbeitet wurde und sich schon in den Steirischen Gußstahlwerken in Judenburg

bewährt hat: statt mit Schwefelsäure wird nach Lösen in Salzsäure mit Überchlorsäure abgeraucht: das abgeschiedene Eisensalz löst sich so nach Zusatz von Wasser augenblicklich und während des Rauchens kann störendes Chrom und Vanadium durch messerspitzenweise wiederholten Zusatz von Natriumchlorid verflüchtigt werden, als CrO_2Cl_2 bzw. $VOCl_3$.

Zur Photometrie wird bei den beschriebenen Verfahren aus einem Meßkolben Analysenlösung in die Küvetten eingefüllt. Der Rest bleibt unbenützt. So wird zur eigentlichen Analyse nur ein Teil der in der Einwaage vorhandenen Menge des betreffenden Elementes gebraucht. Die Substanzmengen in den Küvetten liegen weit unter denen, wie sie etwa in der organischen Mikroanalyse verwendet werden; auf Grund der Arbeitsvorschrift bei der Cu-Bestimmung werden 500 γ, bei der Pb-Bestimmung in Erzen 7 γ photometriert, bei Gehalten von je 0,1‰.

Die für eine photometrische Bestimmung nötigen Einwaagen würden sich noch wesentlich verkleinern lassen durch Arbeitsvorschriften, nach denen schließlich statt nur eines Teiles die ganze Analysenlösung einzufüllen ist, und durch empfindlichere Farbreaktionen. Das ist aber nicht der Ehrgeiz des Eisenhüttenchemikers. Seine erste Aufgabe ist die genaue und zeitgerechte Erledigung der täglich einlaufenden Analysen (bei der VÖEST derzeit etwa 600 täglich).

Da unter diesen Umständen die Bestimmung kleiner Substanzmengen im Eisenhüttenlaboratorium eine überragende Bedeutung hat, ist es nötig, die Ausbildung hierfür auf breite Basis zu stellen, so daß Wissenschaftler und Praktiker womöglich noch mehr voneinander lernen als bisher.

Zusammenfassung.

In technischem Eisen zu bestimmende Elemente (wie C, Mn, P, S) sind meist nur in Mengen von Zehntel- bis Hundertstelprozenten zugegen, so daß bei der Analyse nur Milligramme bis Zehntelmilligramme mit der nötigen Genauigkeit mit Hilfe von Arbeitsweisen zu erfassen sind, die auch bei der eigentlichen Mikroanalyse angewendet werden.

Anreicherung von Spuren in Eisen kann durch Ausäthern der oxydierten salzsauren Lösung erfolgen, wodurch das Eisen aus der wäßrigen Phase geht. Ohne Einschleppen von Verunreinigungen erfolgt die Vorbereitung hierzu durch Lösen der Einwaage in Bromwasser und Behandlung mit Chlorwasserstoff und Chlor. Bromwasser als neutrales Lösungsmittel kann auch zur Isolierung nichtmetallischer Einschlüsse verwendet werden.

Mit Hilfe des Pulfrichphotometers sind viele kleine Zusätze oder Verunreinigungen bestimmbar. Genauer wird die Ermittlung von Al

in Stählen (einige Hundertstel-Prozente) mit Eriochromcyanin und von Pb in Eisenerzen (bis zu einigen Zehntel-Prozenten) besprochen.

Summary.

The elements (e. g. C, Mn, P, S) to be determined in technical iron are usually present only in tenths or hundredths of a percent. Consequently, only milligrams to tenths of milligrams can be handled with the necessary accuracy by the use of procedures which are also employed in real microanalysis. Accumulation of traces in iron can be secured by ether extraction of the oxidized HCl-solution, since most of the iron leaves the water layer. The steps preliminary to the extraction can be carried out without danger of introduction of impurities if the sample is dissolved in bromine water and then treated with hydrogen chloride and chlorine. Bromine water as a neutral solvent can also be used for the isolation of non-metallic inclusions.

Many small additives or contaminants may be determined with the aid of the *Pulfrich* photometer. The determination of Al in steels (several hundredths percent) with eriochromcyanine, and of lead in iron (up to several tenths percent) are discussed in more detail.

Résumé.

Les éléments à déterminer (comme C, Mn, B, S) dans le fer technique sont présents, le plus souvent en quantités allant seulement du dixième au centième %, de sorte que par l'analyse, les mg seulement sont exprimés avec la précision nécessaire, jusqu'à des dixièmes de mg, par des méthodes de travail qui ont utilisé la microanalyse proprement dite. L'enrichissement des traces dans le fer peut réussir par épuisement à l'éther de la solution chlorhydrique oxydée, grâce auquel le fer se concentre dans la phase éthérique. Pour cela, on réussit la préparation sans entrainer d'impuretés, en dissolvant la prise d'essai dans l'eau de brome et traitement avec l'eau de chlore et le chlore. L'eau de brome, comme dissolvant neutre, peut aussi être utilisée pour l'isolement des inclusions non métalliques.

Au moyen du photocolorimètre de *Pulfrich*, on peut déterminer beaucoup de petites additions et des impuretés. Très précise est l'évaluation de l'aluminium dans l'acier (quelques centièmes %) avec l'ériochromecyanine, du plomb dans le fer (jusqu'à quelques dixièmes %).

Literatur.

[1] *Th. Heczko*, Berg- und Hüttenmännische Monatshefte **92**, 125 (1947).
[2] *W. Koch*, Arch. Eisenhüttenwes. **12**, 69 (1938/39).
[3] *H. Fischer* und *G. Leopoldi*, Z. angew. Chem. **47**, 90 (1934).
[4] *H. Müller*, Z. analyt. Chem. **113**, 161 (1938).

AB Svenska Metallverken, Västerås, Schweden.

Über einige praktische und theoretische Probleme der Mikrohärteprüfung.

Von

E. B. Bergsman.

Mit 8 Abbildungen.

(Eingelangt am 23. August 1950.)

Das Interesse für die Mikrohärteprüfung ist im Zunehmen. Die wichtigste Ursache hierfür ist die, daß diese Methode Messungen ermöglicht, die früher nicht möglich waren, wie z. B. bei sehr kleinen Proben, dünnen Außenschichten, Folien, sprödem Material, Schweißfugen, kaltbearbeiteten Stellen, einzelnen Strukturbestandteilen in einer Probe, Diffusionsverlauf und Kristallseigerung. Siehe z. B. [1, 2].

Abb. 1 zeigt ein Beispiel einer Mikrohärtemessung an einem C-Stahl, mit 1,5% C, gehärtet bei 1200° C. Das Gefüge besteht aus Martensit und Restaustenit.

Außer in der Metallographie hat die Methode auch in der Mineralogie[3, 4] und Zahnheilkunde[5] Anwendung gefunden.

Eine weitere Ursache für das gesteigerte Interesse ist, daß es den Augenschein hat, als würde die Methode einen tieferen Einblick in das komplizierte Härteproblem ermöglichen. Es entsteht überhaupt die Frage, ob nicht durch die Mikrohärte ein besseres Verständnis für die Theorie und Praxis der Härtemessungen gewonnen werden kann.

Es soll nun auf verschiedene Faktoren, welche das Meßresultat beeinflussen, näher eingegangen werden.

Das erste ist *die Eichung der angewendeten Optikkombination*. Darauf muß man viel Sorgfalt anwenden, da die Zuverlässigkeit der folgenden Meßresultate von der Eichung abhängig ist. Man muß bedenken, daß die Härtezahl verkehrt proportional den *Quadraten* der Eindrucksdiagonalen ist.

Für Eichzwecke verwendet man gewöhnlich Objektmikrometer, welche für die Bestimmung der Vergrößerung im Mikroskop vorgesehen

sind. Aus zwei Gründen indessen scheint eine genauere Eichmethode notwendig zu sein. Denn:

1. sind die Objektmikrometer zu grob geritzt,

2. haben Objektmikrometer verschiedener Erzeugung nicht immer gleiche Resultate ergeben.

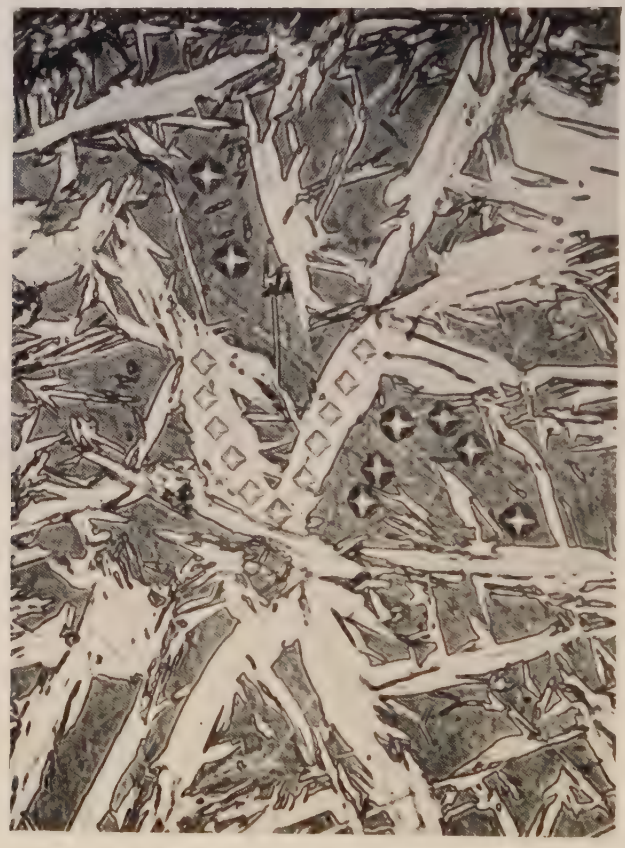


Abb. 1. Vickerseindrücke in einem C-Stahl mit 1,5% C, gehärtet bei 1200° C. Eindrucksbelastung 10 g. Vickershärte: Martensit: 1060 kg/mm², Restaustenit: 620 kg/mm²; 900 .

Nun ist aber bekannt, daß Gitter für spektralanalytische Messungen (optische Gitter) eine sehr hohe Genauigkeit haben.

Durch freundliches Entgegenkommen des Vorstandes des Nobelinstitutes, Herrn Prof. *M. Siegbahn*, wurde ein spezielles Eichgitter hergestellt. Außer der sehr hohen Genauigkeit — der Abstand zwischen den Linien hat eine Genauigkeit von 0,01 bis 0,001 μ — hat dieses Gitter den Vorteil gegenüber Objektmikrometern, daß die Linien feiner sind.

Abb. 2 zeigt ein gewöhnliches Objektmikrometer verglichen mit einem optischen Gitter nach *Siegbahn*.

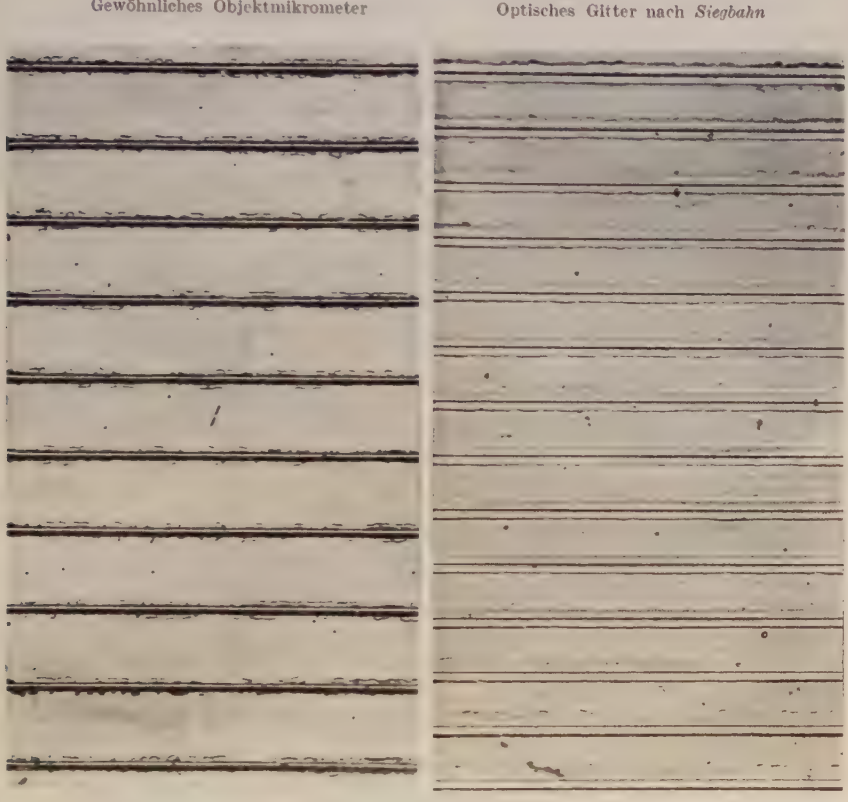


Abb. 2. Vergleich zwischen den Linien eines gewöhnlichen Objektmikrometers und eines optischen Gitters nach *Siegbahn*.

Die Linien des *Siegbahn*schen Gitters zeigen Rillen, welche eine schärfere Einstellung der Meßlinien ermöglichen.

Abb. 3 zeigt das Ergebnis einer solchen Eichung. Dabei wurden alle Angaben betreffend Belichtung, Filter, Blende usw. vermerkt. Diese Faktoren wurden bei der Messung der Vickerseindrücke unverändert gleichgehalten.

Jeder Meßpunkt in diesem Diagramm stellt einen Mittelwert aus vielen Bestimmungen dar.

Bemerkenswert ist, daß der Meßfaktor *nicht konstant* ist. Er ist hier für kleine Meßlängen geringer als für größere. Soweit bekannt, wird in der Literatur keine Rücksicht auf diesen Umstand genommen.

Die nächste Frage ist die Abhängigkeit der Härtezahl von der Eindrucksgeschwindigkeit.

Diese Frage wurde mit zwei Apparaten untersucht.

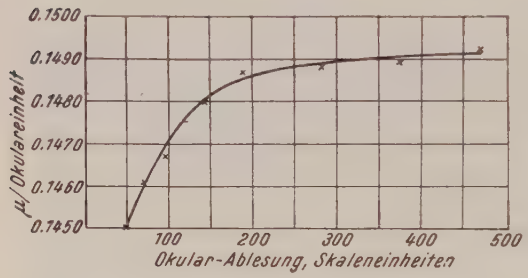


Abb. 3. Eichfaktor „μ/Okulareinheit" als Funktion der Okularablesung, für eine bestimmte Optik-Kombination.

Der eine — Abb. 4 — mit einem Belastungsbereich von zirka 0,5 bis 500 g ist bereits in der Literatur[1, 2] beschrieben und arbeitet nach dem Prinzip einer Waage.

Der andere — Abb. 5 — ist eine Spezialkonstruktion für direkte Gewichtsbelastung zwischen 500 und 5000 g.

Abb. 6 zeigt die Abhängigkeit der Härtezahl von der Belastungsgeschwindigkeit.

Es wurden drei verschiedene Belastungen verwendet, und zwar 25 bzw. 200 bzw. 2000 g.

Bei niedrigen Belastungen ist die Abhängigkeit von der Geschwindigkeit größer als bei hohen. Die Kurven überschneiden sich. *Richtig*

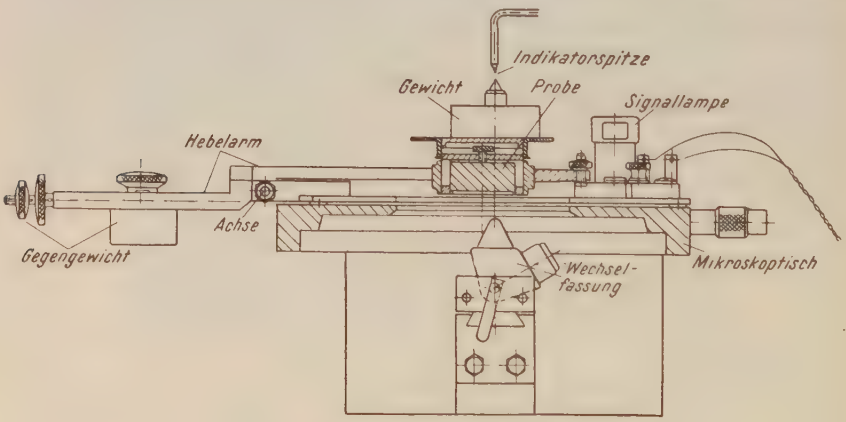


Abb. 4. Mikrohärteprüfer nach *Bergsman*.

ist es, eine niedrige Geschwindigkeit zu wählen, zur Vermeidung des dynamischen Belastungszuschusses, welchen man bei hoher Geschwindigkeit erhält und der um so bedeutungsvoller ist, je geringer die Belastung ist.

Möglicherweise sind die verschiedenen Ansichten, welche in der Literatur über die *Belastungs*abhängigkeit der Härtezahl vorkommen,

teils auf mangelhafte Eichung der Optikkombination und teils auf ungenügende Beachtung des Geschwindigkeitseinflusses zurückzuführen.

In der Frage der Bedeutung der *Belastungszeit* wurde durch Untersuchungen an drei verschiedenen Werkstoffen (Weicheisen, austenitischer rostfreier Stahl und Martensit) gefunden, daß die Belastungszeit ohne weiteres auf 5 Sekunden gesenkt werden kann. Ob dies auch bei anderen Werkstoffen der Fall ist, muß näher untersucht werden.

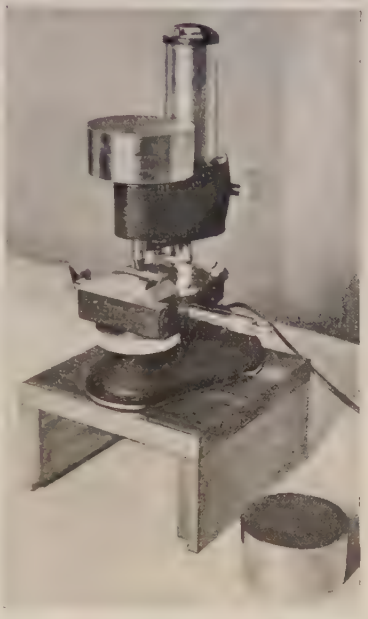


Abb. 5. Vickershärteprüfer für direkte Belastung, Belastungsgrenze 500 bis 5000 g, nach *Bergsman*.

Von großem Einfluß auf das Meßergebnis sind *Vibrationen*, diese müssen daher unter allen Umständen vermieden werden.

Es ist selbstverständlich, daß die Proben für die Mikrohärtebestimmung *eine sehr sorgfältige Vorbereitung* erfordern.

Daß bei weichen Werkstoffen, z. B. Fe, Cu, Messing, die mechanische Polierung zu hohe Härtezahlen ergibt, besonders bei niedrigen Belastungen ist ja bekannt; vielleicht weniger, daß dies auch bei harten Werkstoffen der Fall ist, z. B. Martensit, wie Abb. 7 zeigt.

Die mechanisch polierte Probe gibt höhere Härtezahlen als die elektrolytisch polierte. Dies zeigt sich besonders bei niedrigen Belastungen.

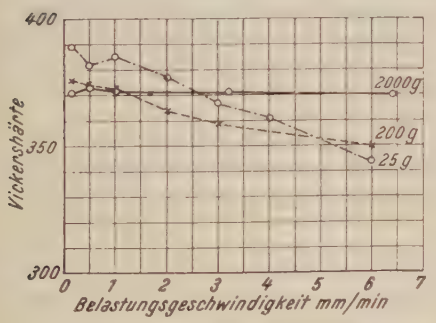


Abb. 6. Einfluß der Belastungsgeschwindigkeit auf die Vickershärte. C-Stahl mit 0,87% C, gehärtet (800° C — 30 Min.) und angelassen (500° C — 1 St.).

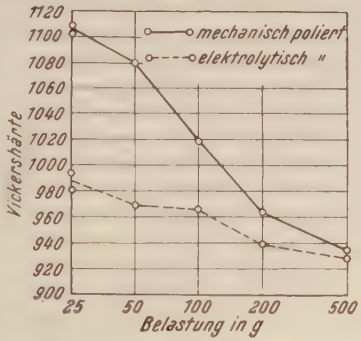


Abb. 7. Einfluß der Probenvorbereitung auf die Vickershärte. C-Stahl (0,96% C), gehärtet (775° C, 10 Min. → Wasser) und angelassen (100° C, 10 Min.).

Das gleiche Resultat wurde auch durch Abschrecken auf —75° C erhalten, daher kann Restaustenit nicht die Ursache sein. Welche auch die wirklichen Ursachen sein mögen — Kaltverformung oder erhöhter N_2-Gehalt der Außenschicht infolge der Schleifung — die Probenvorbereitung ist von der allergrößten Bedeutung bei den Mikrohärtemessungen, besonders wenn niedrige Belastungen angewendet werden.

Bemerkenswert ist weiter, daß auch *bei der elektrolytisch polierten Probe eine Belastungsabhängigkeit der Härtezahl zu beobachten ist.*

Mit einigen Ausnahmen[6, 7] wurde im allgemeinen[3, 8–14] eine Belastungsabhängigkeit analog der unteren Kurve (Fig. 7), d. h. höhere Härtezahl bei niedrigen Belastungen gefunden. Dies ist auch dann der Fall, wenn die Probenvorbereitung so durchgeführt wird, daß eine harte Außenschicht *unter keinen Umständen* denkbar ist, z. B. elektrolytische Polierung einer im Vakuum geglühten Probe. Da es nicht gleichgültig ist, ob man die Härtezahl z. B. mit 10 g oder 10 kg Belastung bestimmt, ist es wichtig, *eine Gesetzmäßigkeit* zu finden, welche die Umrechnung der Mikrohärtezahl zu einer konventionellen Härtezahl ermöglicht. Gleichzeitig hat diese Frage Bedeutung für das Verständnis über die Natur der Härteprobe.

Wir wissen, daß sich die metallischen Werkstoffe hinsichtlich *Härte und Elastizität* verschieden verhalten. Einige sind hart und elastisch, andere hart und unelastisch usw. Gegen die gewöhnlichen Härtebestimmungsmethoden, z. B. Brinell, Vickers und Rockwell, kann man nun einwenden, daß man mit diesen nur die Größe der permanenten oder plastischen Deformation erfassen kann. Es ist aber unangenehm, nichts über die elastische Deformation zu wissen. Eine Härtezahl sollte ja, gleich der Zugprobe, die Summe der elastischen und plastischen Verformung enthalten.

Durch direkte Bestimmungen wurde versucht, jene Härtezahl zu erfassen, die sowohl der elastischen wie auch der plastischen Verformung entspricht. Zu diesem Zweck wurde ein Eindrucksdifferenzmesser gebaut, mit welchem man die Eindruckstiefe sowohl unter Belastung wie auch nach der Entlastung messen kann. Eine Korrektur für die unvermeidliche Apparatfederung wurde berücksichtigt.

Indessen wurde bei den Messungen eine so große Rückfederung beobachtet, daß diese unmöglich korrekt sein konnte. Die Ursache dafür dürfte sein, daß auch die Teile *rund um* den Eindruck elastisch niedergedrückt werden.

Zur gleichen Zeit erschienen die Veröffentlichungen von *Tate*[12] bzw. *Tarasow* und *Thibault*[15], in welchen folgende Gedankengänge entwickelt werden:

Ausgehend von dem Umstand, daß die Eindrucksform unabhängig von Eindrucksbelastung und Eindrucksgröße ist, wird angenommen, daß

die Spannungsverteilung rund um die nicht rückgefederten Eindrucksecken unabhängig von der angewendeten Eindrucksbelastung ist. Nachdem die Spannungsverteilung der Faktor sein sollte, welcher die elastische Rückfederung bestimmt, ist die Folge des vorher zitierten Gedankenganges, daß die Größe der elastischen Rückfederung von der Eindrucksbelastung unabhängig ist. Folglich müßte man die Diagonallänge des nicht rückgefederten Eindruckes erhalten, indem man zu der gemessenen Diagonallänge eine konstante Korrekturlänge, Δl, addiert.

Wenn man nun die Härte bei verschiedenen Belastungen bestimmt, so wird begreiflicherweise die elastische Rückfederung Δl eine größere Bedeutung für die Härtezahl bei kleinen Eindrücken haben als bei großen. Die Rückfederung bewirkt kleinere Eindrücke, d. h. höhere Härtezahlen, und zwar besonders bei niedrigen Belastungen. Damit ist es möglich, die Konstante Δl, das Maß der elastischen Rückfederung, zu bestimmen. Das haben die vorher genannten amerikanischen Verfasser getan. Diese verwendeten einen Knoop-Eindrucksdiamant, dessen Form eine größere Rückfederung bewirkt als der Vickers-Diamant.

Nach dem folgenden Berechnungsgang kann man Δl für die Vickersprobe erhalten:

Gemessene Härtezahl (H_m):

$$H_m = \frac{1854 \cdot P}{d_m^2}$$

Nichtrückgefederte Härtezahl (H_u):

$$H_u = \frac{1854 \cdot P}{d_u^2} = \frac{1854 \cdot P}{(d_m + \Delta l)^2}$$

Dabei ist:

P = Belastung in g,
d_m = gemessene Diagonallänge in μ,
d_u = Nichtrückgefederte Diagonallänge in μ,
Δl = Korrektionskonstante, abhängig von der elastischen Rückfederung in μ.

Aus diesen zwei Gleichungen erhält man:

$$\frac{H_u}{H_m} = \frac{d_m^2}{(d_m + \Delta l)^2}$$

also

$$H_u \cong H_m \cdot \frac{1}{1 + \frac{2\,\Delta l}{d_m}}$$

H_m und d_m ergeben sich aus der Messung.
Δl kann berechnet werden durch Auflösung von verschiedenen Gleichungskombinationen.

Die Berechnung wurde durchgeführt auf Grund von Messungen an Martensit, austenitischem 18/8 Stahl und Ferrit.

Abb. 8 zeigt das Resultat von Messungen an 18/8 Stahl.

Die Δl-Werte wurden mit $1{,}2\,\mu$ bestimmt. Eine Berechnung der nichtrückgefederten Härtezahl wurde auch durchgeführt und ein vom prak-

tischen Gesichtspunkt aus konstanter H_u-Wert innerhalb der Belastungsgrenzen von 25 bis 2000 g erhalten. Bei den niedrigsten Belastungen ergab sich eine Abweichung, welche nicht durch Meßfehler erklärt werden kann. Worauf diese Abweichung beruht, ist nicht klar. Trotzdem ist scheinbar auf diese Art eine Vickerszahl zu erhalten, welche sowohl die elastische wie auch die plastische Deformation enthält und welche von der Eindrucksbelastung unabhängig ist. *Das Ziel ist also, den Δl-Wert für verschiedene Werkstoffe zu bestimmen.*

Durch diese Überlegungen fänden zwei ungeklärte Fragen auf einmal ihre Lösung. Man erhielte einerseits Klarheit über die Ursache der Belastungsunabhängigkeit bei der Vickersprobe, andrerseits bekäme man wertvolle Einsicht in die Rolle der elastischen Rückfederung bei der Vickersprobe.

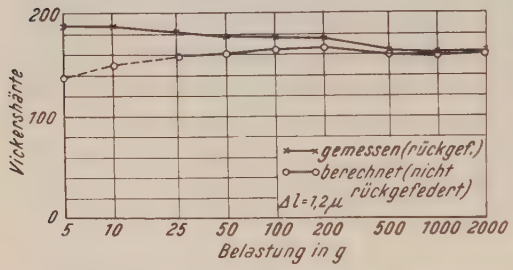


Abb. 8. Vickershärtezahl von rückgefederten (gemessen) und nichtrückgefederten (berechnet) Eindrücken. Austenitischer rostfreier Stahl (18% Cr, 8% Ni), kaltgewalzt, mechanisch poliert, im Vakuum geglüht (1050° C) und danach elektrolytisch poliert.

Daß eine elastische Rückfederung vorkommt, wurde auch durch andere Methoden bewiesen, z. B. durch direkte Messungen an dem Eindruckskörper (*Tate*[12] bzw. *Brodie* und *Smoluchowski*[16]). Die experimentellen Schwierigkeiten sind jedoch groß und andere Forscher konnten die elastische Rückfederung nicht nachweisen. Viele Tatsachen sprechen dennoch dafür, daß die Belastungsabhängigkeit bei der Vickersprobe durch die elastische Rückfederung verursacht wird. Im Gegensatz zur elastischen Rückfederungstheorie haben andere Forscher[3, 7, 8, 9, 17, 18, 19] die *Meyer*sche Gleichung[20] benützt, um die Belastungsabhängigkeit zu erklären. Aus drei Gründen aber dürfte dies nicht einwandfrei sein:

1. Die *Meyer*sche Gleichung gilt nur für kugelförmige Eindruckskörper, welche bei verschiedenen Eindringtiefen nicht geometrisch ähnlich sind, was wohl bei der Vickerspyramide der Fall ist.

2. Der zweite Grund ergibt sich aus der Anwendung der *Meyer*schen Gleichung für einen kugelförmigen Eindruckskörper.

Die *Meyer*sche Gleichung für die Brinellprobe lautet:

$$P = a \cdot d^n$$

Dabei ist:

P = Belastung
d = Durchmesser des Eindrucks
a = materialabhängige Konstante

n = Konstante, abhängig vom Kaltverfestigungsvermögen des Materials.

Für $n > 2$: Härte nimmt zu während der Kaltverformung
$n = 2$: Härte bleibt unverändert während der Kaltverformung
$n < 2$: Härte nimmt ab während der Kaltverformung.

O'Neill[21] gibt folgende Werte an:

Cu, weichgeglüht	$n = 2{,}43$
„ 20%-Verformung	$n = 2{,}05$
„ 90%-Verformung	$n = 2{,}00$.

Versucht man nun bei der Vickersprobe die *Meyer*sche Gleichung anzuwenden für den Fall, daß man bei niedrigen Belastungen eine höhere Härtezahl bekommt, so erhält man einen n-Wert, welcher kleiner als 2 ist. Das würde bedeuten, daß die Härte des Materials bei einer Kaltverformung abnimmt. Die praktischen Erfahrungen aber zeigen das Gegenteil.

3. Der dritte Grund endlich liegt darin, daß man gezwungen ist, wie *Onitsch*[3] ausführte, für verschiedene Belastungsgebiete verschiedene n-Werte anzunehmen. Damit hätte man *einen* n-Wert für das Mikrogebiet und *einen* für das Makrogebiet. Der Exponent „n" ist aber *eine Materialkonstante* und es gibt keine Ursache, eine solche Grenze zwischen Makro- und Mikrohärte zu ziehen.

Zusammenfassung.

Der Einfluß folgender Faktoren auf das Meßresultat von Mikrohärtebestimmungen wird besprochen:

1. Eichung der Optikkombination.
2. Belastungsgeschwindigkeit.
3. Belastungszeit.
4. Vibrationen.
5. Probenvorbereitung.

Die praktisch und theoretisch bedeutungsvolle Frage *der Belastungsabhängigkeit der Härtezahl* wird erörtert. Es wird angenommen, daß die Belastungsabhängigkeit der Härtezahl auf die elastische Rückfederung zurückzuführen ist.

Summary.

The influence of the following factors on the micro-determination of hardness is discussed:

(*a*) calibration of the optical combination;
(*b*) loading rate;
(*c*) charging time;
(*d*) vibrations;
(*e*) preparation of samples.

The practical and theoretically important question of loading-dependence of the hardness number is mentioned. It is assumed that the loading dependence of the hardness number is to be attributed to the elastic backlash.

Résumé.

On explique l'action des facteurs suivants sur le résultat de la mesure de micro-dureté:

1° Etalonnage du dispositif optique,
2° Vitesse de charge,
3° Durée de charge,
4° Vibrations,
5° Préparation de l'échantillon.

On discute la question de grande portée pratique et théorique relative à la dépendance entre la charge et le chiffre de dureté. On admet que la dépendance de celui-ci est rapportée à la suspension de rappel élastique.

Diskussion.

H. *K. Cada* (Wien): Tritt nicht nur bei C-Stählen sondern auch bei anderen Metallen, Cu, Al, Messing, Cr/Ni-Stahl der Härteunterschied zwischen mechanisch und elektrisch polierter Oberfläche auf? Wurden auch die Elektrolyte gewechselt?

H. *E. B. Bergsman*: Der Härteunterschied ist bei Cu z. B. noch deutlicher sichtbar als bei C-Stahl und auch bei anderen Metallen deutlich. Die Elektrolyte wurden nicht geändert. C-Stahl wurde mit Perchlorsäureelektrolyt elektropoliert. Die auftretende anodische feine Oxydhaut scheint hier nicht zu stören.

Literatur.

[1] *E. B. Bergsman*, Jernkontorets Annaler **128**, 81 (1944).

[2] *E. B. Bergsman*, Schweizer Archiv für angewandte Wissenschaft und Technik, **14**, 294 (1948).

[3] *E. M. Onitsch*, Berg- und Hüttenmännische Monatshefte, Wien, **93**, 7 (1948).

[4] *H. Winchell*, American Mineralogist, **30**, 583 (1945).

[5] *G. Gustafsson* und *Ö. Kling*, Odontologisk Tidskrift, Göteborg, Schweden, **23**, (1948).

[6] *R. F. Campbell*, *Q. Hendersson* und *M. R. Donleavy*, Trans. Amer. Soc. Met., **40**, 954 (1948).

[7] *W. Rostoker*, J. Institute of Metals, **77**: **2**, 175 (1950).

[8] *F. Schulz* und *H. Hanemann*, Z. Metallkunde **33**, 124 (1941).

[9] *E. O. Bernhardt*, Z. Metallkunde **33**, 135 (1941).

[10] *W. Bischof* und *B. Wenderott*, Arch. Eisenhüttenwesen **15**, 497 (1941/42).

[11] *F. Knoop*, *C. G. Peters* und *W. B. Emerson*, J. Research Nat. Bur. Stand. **23**, 39 (1939).

[12] *D. R. Tate*, Trans. Amer. Soc. Met. **35**, 374 (1945).

[13] *N. W. Thibault* und *H. L. Nyqvist*, Trans. Amer. Soc. Met. **38**, 271 (1947).

[14] *E. B. Bergsman*, Jernkontorets Annaler **129**, 577 (1945).

[15] *L. P. Tarasov* und *N. W. Thibault*, Trans. Amer. Soc. Met. **38**, 331 (1947).

[16] *C. B. Brodie* und *R. Smoluchowski*, Diskussion über die Untersuchungen von *Tate* (12).

[17] *H. E. Bernhardt*, Steel, Febr. 25, 1946.

[18] *H. Hanemann*, Arch. Eisenhüttenwesen **15**, 403 (1941/42).

[19] *R. Mitsche* und *E. M. Onitsch*, Mikroskopie, **3**, 257 (1948).

[20] *F. Meyer*, Z. VDI **52**, 645, 740, 835 (1908).

[21] *H. O'Neill*, The Hardness of Metals and its Measurements, London 1934.

Aus dem Institut für Metallkunde an der Montanistischen Hochschule in Leoben.

Mikrohärte und Bindungsart.

Von

R. Mitsche und E. M. Onitsch.

Mit 5 Abbildungen.

(Eingelangt am 19. Juli 1950.)

Einleitung.

Die Mikrohärte ist eine in ihrer Definition konventionell festgelegte Eigenschaft fester Körper und ist daher als Identifizierungsverfahren für solche grundsätzlich geeignet. Die Bestimmung der Mikrohärte erfolgt in weitgehender äußerer Analogie zu anderen technischen Verfahren zur Ermittlung der Eindringhärte (*Brinell, Vickers, Rockwell*) in der Weise, daß eine Diamantpyramide in eine Oberfläche des zu prüfenden Stoffes mit einer bestimmten Kraft P eingedrückt wird, wodurch ein bleibender Eindruck mit einer bestimmten Oberfläche O entsteht. Das Verhältnis von P geteilt durch O ergibt die Mikrohärte, die meist in kg/mm² angegeben wird. Es wird hier ausdrücklich darauf verwiesen, daß sich alle folgenden Betrachtungen nur auf solche Fälle beschränken, wo einzelne Kristalle, seien es solche in einem Kristallhaufwerk oder überhaupt Einkristalle, geprüft werden und wo die Größe des Eindruckes nur einen Bruchteil der Größe des Kristalles selbst beträgt. Es handelt sich also hier um eine „Mikro-Einkristall-Eindringhärte".

Die Berechtigung, die Mikrohärtebestimmung als echtes Mikro-Identifizierungsverfahren zu kennzeichnen, geht aus der Tatsache hervor, daß es möglich ist, an Teilchen von 5 bis 10 μ mehrere Eindrücke zu machen, d. h. man kann Einzelteilchen mit einem Volumen von 10^{-6} bis 10^{-7} λ prüfen.

1. *Die verschiedenen Arten der Identifizierungsverfahren von Stoffen* lassen sich in drei Hauptgruppen einteilen:

a) Solche, die auf der *Summe gleicher Einzelwirkungen* von Atomen oder Molekülen beruhen, auch ohne daß diese in irgendwelchem Ordnungszustand vorliegen. Hierher gehören: Reaktionen der Atomkerne (Absorptionsanalyse, Massenspektrographie, künstliche Radioaktivität), Reaktionen des Atombaues (Spektralanalyse), weiters Ionenreaktionen und schließlich der Nachweis von Molekülen (Molekulargewichtsbestimmung, Ramaneffekt).

b) Verfahren, die auf der *Summierung* von gleichen oder verschiedenen *Einzelwirkungen* beruhen, wobei aber der räumlich-zeitliche *Ordnungszustand* berücksichtigt wird. Hierher gehören alle Verfahren, die den Raumgitteraufbau im weitesten Sinne als Nachweis benutzen.

c) Verfahren, wo eine *Summenwirkung* gleichartiger oder verschiedener *Einzelfaktoren* bei Vorliegen einer räumlich-zeitlichen *Ordnung* mit oder ohne Berücksichtigung der *Ordnungskraft* geprüft wird. Hiezu gehören die Verfahren der Bestimmung der *Bindungsart* und *Bindungsstärke*, wie z. B. Messung der elektrischen Leitfähigkeit, der Spaltbarkeit, der Festigkeit, Schmelzpunkte usw.

Es ist klar, daß bei den Verfahren dieser letzten Gruppe alle Abweichungen des Aufbaues vom Idealbau sich besonders stark auswirken können.

2. *Die Mikrohärte*[1-5], die definitionsgemäß als „Mikro-Einkristall-Eindringhärte" bezeichnet werden muß, mißt als Kennzeichen das Verhalten der Stoffe bei der Verschiebung größerer Atom- oder Molekülbereiche von etwa 10^4 bis 10^6 Å Größe ohne Zerstörung des Zusammenhanges, mit einem Wort die *plastische Verformbarkeit*. Es muß offen bleiben, ob es eine allgemein richtige Definition der „Härte" überhaupt gibt, und es scheint zweifelhaft, ob die plastische Verformbarkeit die beste Annäherung ergibt (z. B. *H. O. Neill*[6], *H. Tertsch*[7]).

Durch die Feststellung der plastischen Verformbarkeit an sich kann ein gewisser Rückschluß auf die Bindungsart gezogen werden, wobei zwischen kristalliner und amorpher Plastizität unterschieden und der Zeiteinfluß entsprechend berücksichtigt werden muß.

Durch die Messung irgend einer geeignet gewählten Kennzahl kann man innerhalb einer Stoffgruppe mit gleichartiger Bindung durch die quantitative Messung qualitative Schlüsse ziehen. Aus Gründen der Einfachheit hat man bisher als Kennzahl den Quotienten von aufgewendeter Kraft zur Oberfläche des plastisch erzeugten Eindruckes gewählt (*H. O. Neill*[6], *W. Hengemühle*[6a]). Hier gilt in einfachster Form das *Meyer*sche Potenzgesetz[8] $P = a \cdot d^n$, wobei P die zur Erzeugung des Eindruckes mit dem Durchmesser d notwendige Kraft ist und a und n als Werkstoffkonstanten angesehen wurden. Es sei aber gleich hier darauf verwiesen, daß dies nicht allgemein zutrifft.

Die *Mikrohärteprüfung* besteht im wesentlichen darin, daß meist eine regelmäßige vierseitige Diamantpyramide (als härtest bekannter Stoff) mit 136° Seitenwinkel unter Belastungen von 1 bis etwa 100 g in den zu prüfenden Kristall eingedrückt wird, wobei nach der Entlastung

ein bleibender negativer Pyramideneindruck entsteht. Im folgenden wird nur der Fall behandelt, daß dieser Eindruck im Verhältnis zum untersuchten Kristall klein ist, d. h. etwa höchstens ein Viertel der Kristallgröße beträgt (vgl. auch Literaturzitat 9).

Die Mikrohärteprüfung wurde zunächst für Metalle und Legierungen angewendet und geht vor allem auf die Arbeiten von *H. Hanemann*[1, 2, 3] und seinen Mitarbeitern zurück. In apparativer Hinsicht sei hier noch *H. Lips*[10] als Vorläufer erwähnt. Der erste allgemein angewendete Mikrohärteprüfer wurde aber nach den Angaben von *H. Hanemann* und *E. O. Bernhardt* von *Zeiss* gebaut und kann als allgemein bekannt angesehen werden.

Abb. 1. Mikrohärteprüfer von C. Reichert.

In der Folgezeit wurden in Europa zwei weitere Typen von Härteprüfern entwickelt, von denen insbesondere der von *C. Reichert*[11], Wien, weitgehende Verbreitung gefunden hat und ebenso der von *E. B. Bergsman*[12], Västerås, entwickelte, über den der genannte Autor Näheres mitteilt[12]. Abb. 1 zeigt den *Reichert*-Mikrohärteprüfer, der auf jedem Auflichtmikroskop verwendet werden kann und durch die Nebeneinanderanordnung von Objektiv und Eindruckdiamant gekennzeichnet ist. *E. W. Taylor*[13], London, hat einen auf dem *Bergsman*schen Wagenprinzip beruhenden, in England gebauten Mikrohärteprüfer beschrieben. Die zwei Apparate von *Hanemann-Zeiss* und *Reichert*, von denen Meßergebnisse vergleichend beurteilt wurden, ergaben vollkommen gleiche Anzeigen.

3. Die Mikrohärte metallischer Anschliffe.

Die wichtigsten Ergebnisse der an Anschliffen von metallischen Stoffen durchgeführten Untersuchungen sind

1. die Tatsache, daß die *Mikrohärte belastungsabhängig* ist, d. h. daß der Exponent n des *Meyer*schen Gesetzes von 2 verschieden sein kann. Daher wurden zur eindeutigen Kennzeichnung der Mikrohärte zwei Vorschläge gemacht, nämlich

a) von *H. Hanemann*[1, 2]: die Mikrohärte für 5, 10 und 20 μ Diagonalenlänge, und

b) von *E. M. Onitsch*[4, 5], den Exponenten n und die Mikrohärte bei 10 μ Eindruckdurchmesser anzugeben.

Beide Angaben enthalten die wesentliche Erkenntnis, daß für die Mikrohärte sowohl der Exponent n als auch die Härte an sich, in kg/mm² ausgedrückt, wesentlich ist; jedoch enthält der *Hanemann*sche Vorschlag das n nur implizite, so daß die zweitgenannte Art der Angabe meist zweckmäßiger ist. Für reine Vergleichsmessungen ist innerhalb gewisser Grenzen auch der von *H. Bückle*[14, 15] gemachte Vorschlag brauchbar, die Eindruckgröße bei bestimmten standardisierten Belastungen anzugeben.

2. Die zweite wesentliche Feststellung betrifft die *Meßgenauigkeit*. Beim Vorliegen homogener Probenoberflächen kann man bei größeren Eindrücken (10 bis 20 μ) eine Genauigkeit von $\pm 2\%$, bei Eindrücken unter 10 μ eine solche von ± 3 bis 5% erreichen. Praktisch bedeutet dies, daß größere Abweichungen auf Ungleichmäßigkeiten an der geprüften Oberfläche zurückzuführen sind.

Die Mikrohärteprüfung von metallischen Werkstoffen ist heute bereits ein vollständig durchgebildetes Identifizierungsverfahren, das für alle metallischen Werkstoffe in größtem Ausmaß praktisch verwendet wird.

Um aber die Mikrohärteprüfung in der hier beschriebenen Art ganz *allgemein* verwendbar zu machen, mußten eine Reihe von Einflußgrößen näher untersucht werden.

Wir haben hierzu einige Beiträge veröffentlicht[16–19].

4. Die Erweiterung des Anwendungsgebietes der Mikrohärteprüfung.

Hier mußten zunächst folgende Punkte geklärt werden:

a) Festlegung des allgemeinen Zusammenhanges von Prüflast und Eindruckgröße,

b) die Feststellung, ob die Eindringhärte prinzipiell belastungsabhängig ist,

c) die Feststellung des Zusammenhanges der Härtewerte auf natürlichen Flächen und auf Anschliffen, d. h. allgemein die Klärung des Einflusses einer mechanischen Bearbeitung,

d) der Einfluß der Bindungsart auf die Mikrohärte.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Punkte a und b wurden von uns bei der Internationalen Pulvermetallurgischen Tagung in Graz bekanntgegeben[16, 17]. Sie beinhalten im wesentlichen folgendes:

Das *Meyer*sche Potenzgesetz $P = a \cdot d^n$ ist nur ein Spezialfall eines allgemeinen Gesetzes, und zwar sind sowohl a als auch n Funktionen des Eindruckdurchmessers d. Weiters wurde gezeigt[18], daß die Eindruckhärte auch im Makrobereich, der aber hier nicht behandelt wird, ebenfalls prinzipiell belastungsabhängig ist.

Zur Klärung der Punkte c und d haben wir eingehend die Verhältnisse bei *Mineralien* untersucht[19], wobei sich folgende wesentliche Feststellungen ergaben:

5. Ergebnisse der eigenen Untersuchungen an Mineralien.

a) Alle auch sonst als spröde geltenden Mineralien, wie z. B. Korund, lassen sich bei kleinen Eindrücken (3 bis 6 bis 10 μ Diagonalenlänge) plastisch ohne Rißbildung und Brucherscheinungen verformen.

b) Das erweiterte *Meyer*sche Gesetz gilt auch bei Mineralien, d. h. die Mikrohärte ist grundsätzlich belastungsabhängig.

c) Der bei Metallen zwischen der Mikrohärte 10 μ und dem Exponenten n gefundene Zusammenhang, wonach mit steigender Härte der Wert von n abnimmt, hat sich auch bei Mineralien bestätigt.

d) Zwischen natürlichen Flächen und Anschliffen bestehen Härteunterschiede, wobei die Anschliffe härter oder weicher sein können als die natürliche Fläche.

e) Die *Streuung*, bedingt durch die Meßgenauigkeit, ist bei nicht gestörten natürlichen Kristallflächen *sehr gering* und beträgt z. B. bei Kochsalz als Mittel aus etwa 1000 Einzelmessungen nur $\pm 2\%$, d. h. größere Abweichungen der Mikrohärtewerte sind also auch hier auf Störungen, das sind Kristallbaufehler aller Art, zurückzuführen. Diese Streuungen betragen bei den Mineralien auf natürlichen Flächen und auf Anschliffen im Mittel $\pm 20\%$.

f) Es müssen daher bei gut meßbaren Eindrücken mindestens fünf Belastungsstufen mit je fünf Einzelmessungen, bei schlecht ausmeßbaren Eindrücken fünf Belastungen mit zehn Einzelmessungen durchgeführt werden, um einen brauchbaren Mittelwert zu erhalten.

Trotz der im Vergleich zu den Metallen erheblich größeren Streuung, die, wie nachgewiesen, auf Kristallbaufehler der verschiedensten Art zurückgeführt werden muß, ist die Mikrohärteprüfung auch für Mineralien ein sehr weitgehend anwendbares Hilfsmittel zur Identifizierung.

6. Natürliche Oberflächen und Anschliffe bei Metallen und Mineralien. Ursachen für die festgestellten Unterschiede nach H. Raether.

Zunächst sei noch festgestellt, daß bei Metallen vergleichende Untersuchungen von nicht geschliffenen und geschliffenen Flächen bisher fehlen.

Die Veränderungen, welche durch Schleifen und Polieren, allgemein durch mechanische Bearbeitung an der Oberfläche von Metallen und Mineralen auftreten, sind vor allem durch die Elektronenbeugungsversuche von *H. Raether*[20] und Mitarbeitern, *W. Kranert*, *K. H. Leise* und anderen folgendermaßen geklärt worden:

a) Die Beilbyschicht existiert als solche nicht, d. h. es liegt kein flüssigkeitsähnlicher Zustand der verformten Oberfläche vor.

b) Durch die mechanische Bearbeitung bildet sich bei Metallen an der Oberfläche ein Konglomerat von feinsten Kristalltrümmern, die etwa 10 Å Durchmesser haben und nach dem Kristallinnern zu größer werden. Die Gesamttiefe der so veränderten Oberflächenschicht kann bis zu einigen μ betragen und liegt daher in einer Größenordnung, die bei der Mikrohärtebestimmung eine Rolle spielt.

c) bei Mineralien (NaCl, $CaCO_3$, KBr,LiF) tritt durch Schleifen und Polieren ebenfalls eine Kornzertrümmerung auf, wobei aber die Bruchstücke zirka zehnmal so groß wie bei den Metallen sind, also in der Größenordnung von 100 Å. Diese Unterschiede gegenüber den Metallen werden durch die geringere Plastizität der Mineralien erklärt.

Eine direkte Bestätigung dieser Ergebnisse wurde von *R. D. Heidenreich*[21] gegeben, der elektronenmikroskopisch festgestellt hat, daß sich beim Schleifen an der Oberfläche von Kochsalz kleine Kristalltrümmer bilden.

Für Metalle und Isolatorien gilt nach den Untersuchungen von *Raether*: Je härter, desto weniger tief ist die Schicht dieser feinsten Kristalltrümmer; z. B. beträgt ihre Tiefe unter gleichen Bedingungen, und zwar starke Kaltbearbeitung mit einem Prägestahl, bei Kupfer 4 μ, bei Aluminium 80 μ.

An elektrolytisch polierten Metallen[20, 23, 24] hat sich sowohl das Gefüge als auch die Mikrohärte als gleich der des Kristallinneren ergeben.

7. Folgerungen aus den durch die Bearbeitung hervorgerufenen Oberflächenveränderungen bei Metallen und Mineralien.

Der Mikrohärteeindruck, dessen Tiefe bei einer Pyramide mit 136° Seitenwinkel nur ein Siebentel der Diagonalenlänge beträgt, kann mehr oder weniger in diesen feinkristallinen Zonen liegen. Es handelt sich aber dann nicht mehr um eine Einkristall-Mikro-Eindringhärte, sondern um eine Art „Vielkristall-Mikro-Verschiebungshärte". *Man muß daher grundsätzlich durch die Oberflächenbearbeitung eine Änderung der Mikrohärte erwarten.* Dies trifft auch tatsächlich zu. So hat *K. H. Leise*[22] an Kupfer sowie an LiF, NaCl und KBr eine mit steigender Dauer des Polierens bzw. Prägepolierens immer dicker werdende harte Oberflächenschicht festgestellt. Die eigenen Ergebnisse an Mineralien[19], bei denen durch das Schleifen sowohl Zu- als auch Abnahme der Härtewerte eintreten kann, lassen sich somit zwanglos erklären, je nachdem, ob die feinstkristalline Oberflächenschicht einen größeren oder kleineren „Verschiebungswiderstand" aufweist als der eigentliche Eindringwiderstand (vielleicht als echtes Gleiten zu bezeichnen) der ungestörten Fläche.

8. Prinzipielle Folgerungen für die Mikrohärte im allgemeinen.

Da die Oberfläche jedes Körpers durch Schleifen und Polieren verändert werden kann, müssen *zuerst natürliche* Flächen untersucht werden, weil es möglich ist, daß solche weitgehend störungsfrei ausgebildet sind. Dieser Fall liegt z. B. bei dem untersuchten Kochsalzkristall vor, bei dem die geringe Streuung von $\pm 2^0/_0$ auf weitgehende Störungsfreiheit hinweist. Man darf allerdings nie a priori annehmen, daß natürliche Flächen ideal ausgebildet sind, sondern muß grundsätzlich mit Baufehlern verschiedenster Art rechnen.

Die vielfach bei *kleinen* Eindruckgrößen festgestellten Abweichungen des Exponenten n[16, 17] hängen mit der veränderten Oberflächenschicht zweifellos zusammen. Wahrscheinlich handelt es sich bei den kleinsten Eindrücken von nur einigen μ Größe überhaupt noch nicht um die eigentliche kristalline Plastizität, sondern um reine Relativverschiebung kleinster Kristallite. Hierbei muß allerdings infolge der sehr großen Oberflächenentwicklung damit gerechnet werden, daß die freien Oberflächenkräfte in erheblichem Ausmaß zur Wirkung kommen, d. h. daß praktisch schon während des Entstehens dieser feinsten Kristallite auch wieder ein Zusammensintern derselben eintritt. Man kommt hier in ein Grenzgebiet der Pulvermetallurgie, das wir in unseren Vorträgen[16, 17] bei der IPT behandelt haben. Es wurde dort u. a. auch über Versuche berichtet, welche die Eindringhärte, angefangen von der Makrohärte lose geschütteter Pulver bis zur Mikrohärte der einzelnen Pulverteilchen behandelten, wobei sich zeigte, daß mit steigender Verformung sowohl von Pulverpreßlingen als auch von regulinischen Metallen die *Makrohärte sehr stark*, die *Mikrohärte hingegen nicht* oder *nur wenig ansteigt.*

Es muß allerdings noch offen bleiben, inwieweit eine Übertragung vom Makromodell der geschütteten Pulver mit Teilchengröße 10^5 bis 10^6 Å Durchmesser auf Teilchen von nur 10 Å oder 100 Å möglich ist, da, wie bereits oben erwähnt, bei letzteren schon wieder starke Kohäsion auftreten kann. Alle diese Erscheinungen fallen in ein Arbeitsgebiet, das von dem heute als Mikrohärte bezeichneten zum Teil graduell, zum Teil prinzipiell abweicht und das wir, um es als solches entsprechend zu kennzeichnen, als „*Ultra-Mikrohärte*" bezeichnen möchten.

9. Grundsätzliches über Mikrohärte und Bindungsart.

Beim Eindrücken der Diamantprüfspitze in eine Kristallfläche muß eine Stoffverschiebung eintreten, deren Volumeneffekt gleich dem Volumen der eingepreßten Pyramide ist. Diese Verschiebung setzt sich aus einem *elastischen* und einem *plastischen* Anteil zusammen, von denen der erstere nach der Entlastung zurückgeht. Das Verhältnis von elasti-

schem zu plastischem Anteil wäre an sich schon geeignet, Körper bestimmter Bindungsart zu charakterisieren.

Für Metalle liegen Messungen von *W. Bischof* und *B. Wenderott*[9] vor, welche gezeigt haben, daß die elastische Rückfederung um so stärker wird, je härter das Metall ist. Die gemessenen Werte betragen bei Prüflasten von 50 g allerdings nur einige Prozent. Anderseits hat *E. O. Bernhardt*[3] für die Basisfläche des Graphits gezeigt, daß dort überhaupt nur elastische Formänderungen auftreten, eine Tatsache, die wir[19] an Koksanschliffen ebenfalls bestätigt haben. Weiters haben wir selbst nachgewiesen[19], daß z. B. auf der Prismenfläche von Quarz oft bis 50 g Belastung überhaupt nur elastische Formänderungen auftreten.

Für diese Verschiedenheit der Anteile von elastischer und plastischer Formänderung spielt die Bindungsart offenbar eine wesentliche Rolle; denn bei echt metallisch gebundenen Stoffen konnte rein elastische Verformung bisher noch nie festgestellt werden.

Man könnte also dieses Verhältnis, dessen Bestimmung allerdings etwas zeitraubend und vielleicht noch nicht genügend genau ist, auch zur Kennzeichnung der Bindungsart mit heranziehen. Es gibt hier aber noch verschiedene Schwierigkeiten, insbesondere auch den Einfluß der Orientierung[19], über den u. a. in einer eben erschienenen Arbeit von *H. Tertsch*[25] bei der Untersuchung von Kalkspat ausführlich berichtet wird.

Aber auch die Größe des *plastischen Verformungsanteiles an sich* hängt mit der Bindungsart in verschiedener Weise zusammen; nämlich

1. muß die Bindungsart, natürlich in Zusammenwirken mit dem Gitteraufbau, überhaupt Verschiebungen in der Größenordnung von 10^4 bis 10^5 Å in Zeiten von der Größenordnung von Sekunden ermöglichen (*A. Smekal*)[26];

2. die Beziehungen zwischen *Meyer*-Exponent und Mikrohärte 10 μ, wonach n mit zunehmender Mikrohärte abfällt, sind bisher bei *metallischer* und bei *Ionenbildung* als geltend nachgewiesen worden. In diesem Zusammenhang tritt die plastische Verformbarkeit in doppelter Auswirkung auf:

a) definitionsgemäß spielt nur die bleibende Eindruckgröße bei der Härte eine Rolle und

b) ist der Wert des *Meyer*-Exponenten durch die P—d-Beziehung bestimmt;

3. sind rein elastische Formänderungen bisher bei metallischen Bindungen überhaupt nicht festgestellt worden, wohl aber bei der Ionenbindung.

Es müßte daher zunächst einmal untersucht werden, welche Gesetzmäßigkeiten für die Mikroeinkristallhärte bei Stoffen gelten, die weder metallische noch Ionenbindung aufweisen.

Es ist naheliegend, zu diesem Zweck natürliche, nicht durch Schleifen oder Polieren veränderte Oberflächen heranzuziehen. Weiters erschien es zweckmäßig, in Analogie mit dem elektrolytischen Polieren der Metalle durch Verwendung wasserlöslicher Kristalle die Möglichkeit der Prüfung ungestörter, dem Kristallinneren entsprechender Flächen einzubeziehen.

10. Untersuchungen von Stoffen mit Molekülbindung an natürlichen Flächen und Anschliffen.

Wir haben bereits früher bei der Untersuchung der Mikrohärte der Mineralien gezeigt[19], daß bei der Mikrohärteprüfung folgende Einflußgruppen eine Rolle spielen können:

1. Das Prüfgerät.
2. Die Probe.
3. Der Prüfvorgang.
4. Der Beobachter.

Die dort gemachten Beobachtungen und Erscheinungen gelten, wie zusammenfassend voraus festgestellt werden kann, auch für Stoffe, die weder metallische noch Ionenbindung aufweisen, in ganz gleicher Weise. Es wurden daher sämtliche Prüfbedingungen gleich wie dort gehalten und es gelten auch alle dort gemachten Möglichkeiten und Einschränkungen.

Jedenfalls sind die Prüfbedingungen der im folgenden beschriebenen Versuche so, daß Einflüsse, die nicht in der Probe selbst liegen, praktisch gleich gehalten werden.

I. Kristalline Stoffe.

A. Natürliche Kristallflächen.

Erstes Beispiel: *Kandiszucker.*

Untersucht: Neun Kristalle, je vier Flächen, je 13 Meßreihen. Da von diesem Stoff leicht Kristalle mit genügend großen natürlichen Flächen zu erhalten sind, wurden hier folgende grundsätzliche Untersuchungen durchgeführt:

1. Bestimmung der Streuung.
2. Ermittlung des Orientierungseinflusses.
3. Ermittlung des Einflusses einer Oberflächenbehandlung (Schleifen, Polieren).

Oberflächenaussehen: Etwas stufig, flache Gruben, rauhe und glatte Stellen, im allgemeinen aber nicht sehr ungleichmäßig.

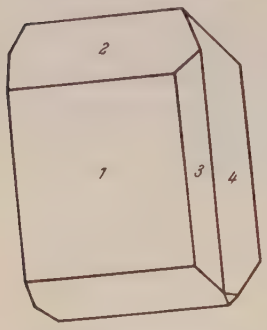


Abb. 2. Kandiszucker. Lage der geprüften Flächen.

Eindrücke: Auf Fläche 1 teilweise *bis 15 g keine Eindrücke,* also offenbar rein elastische Verformung. Eindrücke im allgemeinen gut ausmeßbar.

Auftretende Fehler: Ausbrechen und Aussplittern an den Rändern, Rißbildung, Ausbrechen unter der Oberfläche (Lichthofbildung). Eindrücke stellenweise nicht quadratisch, sondern eingezogene Seiten, aber relativ selten. Rhomboidische Verformungen nur ausnahmsweise.

Besonderheiten: Oft unmittelbar nebeneinander bei gleicher Prüflast Eindrücke mit sehr verschiedener Größe z. B. auf Fläche 1 bei einer Prüflast von 24 g und einem Mittelwert von 24,5 μ unmittelbar nebeneinanderliegende Eindrücke von 18,7 und 41,5 μ.

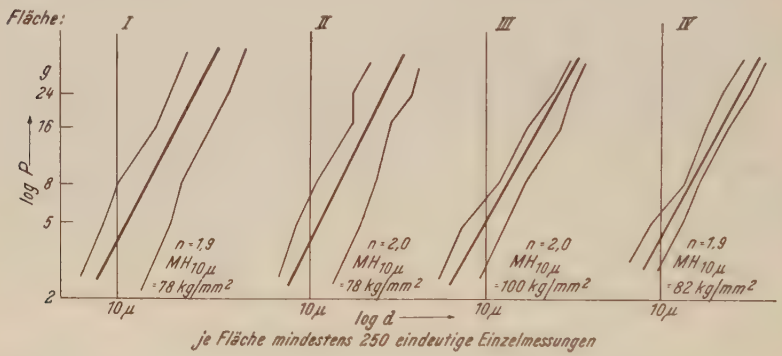


Abb. 2a. log P — log d-Kurven der Flächen 1 bis 4.

Ergebnisse: Nach Durchmessung von *drei* Kristallen (je Fläche 200 bis 250 brauchbare Einzelmessungen) ergaben:

Flächen 1 und 2 $n = 2$, $MH_{10\,\mu} = 60$ kg/mm²,
Fläche 3 ebenfalls $n = 2$, $MH_{10\,\mu} = 80$ kg/mm².

Dieses Ergebnis basiert auf etwa 2000 Einzelmessungen. Es ist deutlicher Orientierungseinfluß vorhanden.

Nach Durchmessung von *neun* Kristallen (je Kristall vier Flächen zu je 13 Meßreihen mit je mindestens vier Meßpunkten, also entsprechend 7000 bis 8000 Einzelmessungen) ergaben sich die Werte gemäß Spalte: „Natürliche Fläche", Tabelle 1.

Die Abb. 2 zeigt die Lage der geprüften Flächen, Abb. 2a die, im untersuchten Bereich praktisch geradlinige log P — log d-Kurve (*Meyer*-Gerade).

Tabelle 1. Mikrohärtewerte $^{n}MH_{10\,\mu}$ in kg/mm² von natürlichen und behandelten Flächen von Kandiszucker.

Fläche	Zustand		
	Natürliche Fläche	+ 1 Minute Wasser	+ Schleifen auf Papier 600
1	$^{1,9}78 \pm 35$—70%	$^{2,0}78$	$^{2,0}87$
2	$^{2,0}78 \pm 35$—70%	$^{1,95}87$	$^{1,75}104$
3	$^{2,0}100 \pm 35\%$	$^{2,0}76$	$^{1,9}93$
4	$^{1,9}82 \pm 35$—70%	$^{2,2}69$	$^{2,1}72$

Gesamtbeurteilung der natürlichen Flächen des Kandiszuckers.

1. Die im Vergleich zu Mineralien und noch mehr zu Metallen sehr großen Streuungen der Mikrohärte weisen auf starke Kristallbaufehler, vielleicht auch verschiedenen Wassergehalt oder andere noch unbekannte Störungsquellen hin.

2. Es ist ein deutlicher Orientierungseinfluß vorhanden.

Zweites Beispiel: *Borneol.*

Untersucht: Ein Kristall, acht Meßreihen.

Tafelige Kristalle, Prüffläche parallel zur Tafelebene (auch Spaltfläche).

Oberfläche: Stark stufig, erhöhte Stellen meist glatt, tiefe rauh.

Eindrücke: Manchmal in glatten und rauhen Stellen bei gleicher Prüflast sehr starke Unterschiede in der Eindruckgröße, teilweise aber sehr stark gestörte Eindrücke.

Fehler: Aus- und Einbrechen mit und ohne Lichthofbildung, teilweise Risse, teilweise kein Eindruck im Lichthof, teilweise nur dunkle Eindruckflächen, die nur annähernd dem Diamant entsprechen. Ausmessung dadurch vielfach schwierig oder unmöglich.

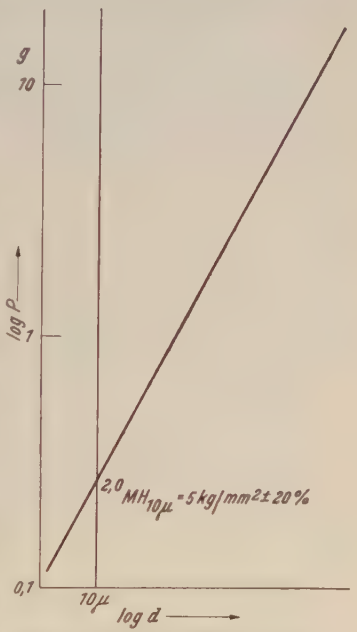


Abb. 3. $\log P - \log d$-Kurve von *Borneol.*

Ergebnisse: Natürliche Fläche $P_{10\,\mu} = 0{,}27$ g, $n = 2{,}0$, $MH_{10\,\mu} = 5$ kg/mm² ± 20%.

Gesamteindruck: Sehr schwierig auszumessen. Die $\log P - \log d$-Beziehung ist praktisch eine *Meyer*-Gerade (Abb. 3).

Drittes Beispiel: *Heliotropin (Piperonal).*

Untersucht: Ein Kristall, drei Meßreihen.

Prüffläche parallel zur natürlichen Spaltfläche.

Oberfläche: Teilweise stark stufig, daher Eindruckränder oft nicht in einer Ebene. Meist rauh, daneben glatte Stellen.

Eindrücke: Stellenweise ohne sichtbare Unterschiede, in der Oberfläche überhaupt *keine Eindrücke* möglich (rein elastische Verformung), Messung meist in rauhen Flächen, weil dort einigermaßen normale Eindrücke, die höchstens am Rand ausgebrochen sind und rhomboidische Verzerrung aufweisen. An glatten Stellen sehr zerrüttete quadratische Eindrücke mit Ausbrüchen und Aufwölbungen oder vollkommen kreisrunde Eindrücke mit Randausbrüchen. Ausmessung in rauhen Flächen gut, mit geringen Streuungen, an den glatten Stellen sehr schwierig oder unmöglich.

Ergebnisse: $P_{10\,\mu} = 0{,}52$ g, $n = 2{,}2$, $MH_{10\,\mu} = 10$ kg/mm² ±?. Streuungsangabe *nicht sicher* möglich, weil nur drei Meßreihen.

Viertes Beispiel: *Thymol.*

Untersucht: Zwei Proben, zehn Meßreihen.

Geprüfte Fläche parallel der natürlichen Prismenfläche.

Oberfläche: Rauh, aber ziemlich gleichmäßig.

Eindrücke: Meist überhaupt kein Diagonalkreuz sichtbar, sondern milchig weiße quadratische Flächen, an denen nach Minuten die Enden der Diagonalen sichtbar werden. Diese Erscheinung wurde bis zu 10 g Prüflast beobachtet.

Fehler: Teilweise rhomboidische Verzerrung. Die Ausmessung der milchigen Eindrücke ist etwas schwierig.

Ergebnisse: Auf 10 μ extrapoliert.

$P_{10\,\mu} = 0{,}48$ g, $n = 2{,}4$, $MH_{10\,\mu} = 9$ kg/mm² ± 40%.

Fünftes Beispiel: *Rhombischer Schwefel.*

Untersucht: Zwei Proben, zehn Meßreihen.

Prüffläche parallel Pyramidenfläche.

Oberfläche: Ziemlich glatt, ohne Besonderheiten.

Eindrücke: Stellenweise ohne ersichtlichen Grund *keine Eindrücke.* Meist regelmäßige Quadrate, hie und da rhomboide Verzerrung.

Fehler: Teilweise leichtes Ausbrechen bzw. Lichthofbildung, aber nur in einer Richtung, ähnlich wie bei Kalzit. Ausmessung im allgemeinen leicht möglich.

Ergebnisse: $P_{10\,\mu} = 2{,}3$ g, $n = 1{,}9$, $MH_{10\,\mu} = 43$ kg/mm² ± 20%.

Sechstes Beispiel: *Terpinhydrat.*

Untersucht: Eine Probe, sechs Meßreihen.

Geprüfte Fläche parallel natürlicher Prismenfläche.

Keine Besonderheiten irgend welcher Art. Leichtes Ausbrechen und Lichthofbildung.

Ergebnisse: $P_{10\,\mu} = 2{,}7$ g, $n = 2$, $MH_{10\,\mu} = 50$ kg/mm² ± 20%.

Siebentes Beispiel: *Chloralhydrat.*

Untersucht: Eine Probe, drei Meßreihen.

Geprüfte Fläche parallel natürlicher Prismenfläche.

Oberfläche: Anlieferungszustand ziemlich glatt, teilweise etwas stufig, nach Einbetten in Plastilin wird Oberfläche rauh.

Eindrücke: Teilweise ganz normal, teilweise aber auch Ausbrüche, Risse, Zerbröckelung, Parallelabschiebungen. Ausmessung teilweise leicht, bei gestörten schwierig, nach Einbetten in Plastilin allgemein schlechter.

Ergebnisse: $P_{10\,\mu} = 2{,}1$ g, $n = 1{,}5$ (sehr auffallend), $MH_{10\,\mu} = 40$ kg/mm² ± ?.

Sichere Streuungsangabe nicht möglich, weil zu wenig Messungen.

Achtes Beispiel: *Antipyrin.*

Untersucht: Eine Probe, drei Meßreihen.

Geprüfte Fläche parallel Basisfläche.

Oberfläche: Glatt.

Eindrücke: Meist scharf, unmittelbar daneben oft unscharfe, teilweise irisierende Ausbrüche.

Ergebnisse: $P_{10\,\mu} = 1{,}34$ g, $n = 2{,}2$, $MH_{10\,\mu} = 25$ kg/mm² ± 20%.

Streuung trotz dreier Meßreihen angebbar, weil relativ kleine Streuungen.

Neuntes Beispiel: *Oxalsäure.*

Untersucht: Eine Probe, fünf Meßreihen.

Geprüfte Fläche parallel Prismenfläche.

Oberfläche: Sehr rauh, ungleich, Löcher.

Eindrücke: Teilweise bis 8 g überhaupt *keine Eindrücke*, vielfach Einbrüche, Rißbildung, unscharfer Rand, sehr häufig stark rhomboide Verzerrung. Ausmessung teilweise sehr schwierig, da oft bis zu zwanzig Eindrücke erforderlich, bis ein brauchbarer entsteht.

Ergebnisse: $P_{10\,\mu} = 2{,}8$ g, $n = 1{,}8$, $MH_{10\,\mu} = 52$ kg/mm² ± 15%.

Zehntes Beispiel (Ionenbindung): *Natrium-Thiosulfat.*

Untersucht: Eine Probe, drei Meßreihen.

Geprüfte Fläche parallel der natürlichen Prismenfläche.

Oberfläche: Keine Besonderheiten.

Eindrücke: Teilweise stark rhomboidische Verzerrung. Ausmessung der normalen Eindrücke leicht.

Ergebnisse: $P_{10\,\mu} = 2{,}2$ g, $n = 1{,}8$, $MH_{10\,\mu} = 41$ kg/mm² ± ?.

Streuung scheinbar klein, aber zu wenig Meßreihen.

B. Bearbeitete Flächen.

Erstes Beispiel: *Kandiszucker.*

a) *Entfernen der natürlichen Oberflächenschicht ohne mechanische Bearbeitung.*

Von der berechtigten Annahme ausgehend, daß durch ein vollkommen gewaltloses Ablösen eventuell gestörter Oberflächenschichten eine dem

Kristallinnern entsprechende Prüfoberfläche geschaffen werden kann, wurde an einer Reihe von Kandiszuckerkristallen von den Flächen 1, 2, 3 und 4 (s. Abb. 2) durch Behandeln mit ruhigem Wasser während 1 Min., die Oberflächenschicht abgetragen. Jede Fläche wurde durch mindestens sechs Meßreihen überprüft. Hierbei ergab sich, daß im allgemeinen durch die Behandlung im Wasser entweder ein Gleichbleiben oder eine Verringerung der Mikrohärte eintritt. Die Fläche 2 zeigte allerdings eine leichte Steigerung von 78 auf 87 kg/mm².

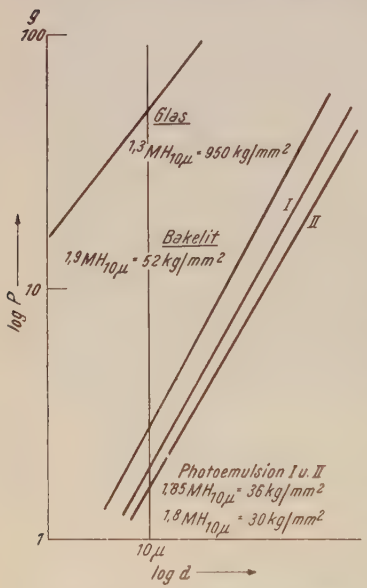


Abb. 4. $\log P$ — $\log d$-Kurven nichtkristalliner Stoffe.

Möglicherweise genügt die einminutige Behandlung noch nicht und es sind hier noch weitere systematische Versuche notwendig.

b) *Entfernen der natürlichen Oberfläche durch Schleifen.*

Zur Feststellung des Einflusses des Schleifens wurden wiederum an denselben Kristallen, die zuerst mit Wasser behandelt worden waren, die Flächen 1 bis 4 mit metallographischem Schleifpapier 600 abgeschliffen und anschließend wiederum die Mikrohärtebestimmung durchgeführt. Hier ergab sich ganz einheitlich eine Steigerung der Mikrohärte, die im Mittel etwa 10 bis 20% betrug. Auch diese Werte sind durch je sechs Meßreihen je Fläche gewonnen.

In Einzelfällen wurde allerdings durch das Schleifen, und zwar nach einer Wiederholung der einminutigen Wasserbehandlung auch teilweise eine Abnahme der Härte festgestellt, doch liegen hierfür zu wenig Versuchsunterlagen für eine eingehende Beurteilung vor.

Die Gesamtzusammenstellung ist schon in der Tabelle 1 gegeben.

Zweites Beispiel: *Borneol.*

An Borneol wurde parallel zur Basisfläche mit dem Messer Material durch Schaben abgenommen.

Oberfläche: Die neue Oberfläche ist teils ganz glatt, offensichtlich durch natürliche Spaltung entstanden, teilweise aber rauh und zwar deutlich weniger rauh als die natürlichen rauhen Stellen.

Eindrücke: Vielfach sind bei Prüflasten bis zu 24 g *keine* Eindrücke erzielbar. Teilweise in der Gegend, wo der Eindruck sein sollte, nur eine weiße Fläche, aber kein Eindruck.

Teilweise findet man statt der Eindrücke offenbar durch Ausbrechen gebildete meist längliche Löcher. Wo Eindrücke überhaupt erzeugt werden können, ergaben sich sehr große Streuungen, deren Mittelwerte allerdings mit der Mittelgeraden der natürlichen Flächen praktisch zusammenfallen, so daß hier Schlüsse noch nicht gezogen werden können.

II. Nichtkristalline Stoffe.

Einige Versuchsergebnisse dieser Art, und zwar an Photoemulsionen (trocken), an bakelitähnlichem Kunstharz und an besonders hartem Photoplattenglas sind in der Abb. 4 dargestellt. Man kann aus den Versuchen grundsätzlich folgendes entnehmen:

1. Man kann nichtkristalline Stoffe genau so prüfen wie kristalline.
2. Die Gesetzmäßigkeit, daß mit steigender Mikrohärte der *Meyer*-Exponent n abnimmt, scheint sich auch hier zu bestätigen.
3. Über die Streuungen kann, da nichtkristalline Stoffe hier vorläufig nur orientierend mituntersucht wurden, noch nichts Näheres ausgesagt werden.

11. Gegenüberstellung der Mikrohärte und n-Werte von Stoffen verschiedener Bindungsart.

In Tabelle 2 sind einige charakteristische Mikrohärte- und n-Werte von Stoffen sehr verschiedener Härte und verschiedener Bindungsart gegenübergestellt. Man kann daraus folgende Schlüsse ziehen:

I. Metalle.

1. Bei metallischen Körpern sind die Streuungen mit ± 2 bis 3% so gering, daß die Mikrohärte bei der üblichen Durchführung der Ermittlung ein sehr genaues Identifizierungsverfahren darstellt, das infolge seiner Empfindlichkeit sogar noch die Feststellung von Unterschieden innerhalb mikroskopisch kleiner Teilchen ermöglicht.

2. Die Gesetzmäßigkeit, daß mit steigender Mikrohärte der *Meyer*-Exponent n abnimmt, erscheint grundsätzlich erfüllt, wenn auch, worauf ausdrücklich hingewiesen wird, der exakte *quantitative* Zusammenhang noch nicht gesichert ist.

3. Der Einfluß der Oberflächenbearbeitung, wie er üblicherweise beim Schleifen und Polieren eintritt, kann zwar noch nicht exakt angegeben werden, weil Vergleichsversuche der Mikrohärte von Anschliffen und natürlichen Flächen bisher noch nicht in genügender Zahl durchgeführt wurden, jedoch gibt die Mikrohärtebestimmung auf mechanisch geschliffenen und polierten Flächen durchaus brauchbare *Vergleichswerte*. Für Absolutmessungen sollten nur elektrolytisch polierte Flächen geprüft werden.

II. Ionenbindung.

1. Bei der Ionenbindung ist bei fehlerlos gebauten Kristallen, wie z. B. bei Kochsalz, die Streuung mit ±2% ebenfalls so klein, daß die Mikrohärtebestimmung an sich durchaus geeignet ist, Härteunterschiede genügend genau festzustellen. Eine Entscheidung darüber, worauf die meist auftretenden Streuungen in der Größenordnung von im Mittel ±20% zurückzuführen sind, kann allgemein nicht gegeben werden. zweifellos spielen Unregelmäßigkeiten im Aufbau, seien es Baufehler im allgemeinen Sinn, seien es Konzentrationsunterschiede in kleinen Bereichen und ähnliches, eine wesentliche Rolle. Anderseits kann aus dem Maß der Streuung ein gewisser Rückschluß auf das Vorhandensein solcher Baufehler gezogen werden. Weiters ist es möglich, Kristallseigerungen und Entmischungen aus sonstigen Gründen auch innerhalb mikroskopisch kleiner Kristalle nachzuweisen.

2. Der Zusammenhang, daß der *Meyer*-Exponent n mit steigender Mikrohärte abnimmt, trifft der allgemeinen Tendenz nach hier ebenfalls zu, doch wären quantitative Angaben noch verfrüht.

Tabelle 2. Mikrohärten und n-Werte von Stoffen verschiedener Bindungsart.

Stoff	Meyer-Exponent n	Mikrohärte 10 μ kg/mm²	Streuung ± %	Geprüfte Fläche
Reinblei	2,0	10	3	
Weicheisen	1,8	170	2	Anschliffe
Wolfram Blech, kaltgewalzt	1,7	480	3	
NaCl (100)	2,0	27	2	
Korund	1,25	2100	25	
Natriumthiosulfat	1,8	41	?	
Oxalsäure	1,8	52	15	
Rhomb. Schwefel	1,9	43	20	
Borneol	1,95	5	20	
Thymol	2,4	9	40	
Heliotropin (Piperonal)	2,2	10	?	Natürliche nicht geschliffene Oberflächen
Antipyrin	2,2	25	20	
Terpinhydrat	2,0	50	20	
Kandiszucker I, II, IV	2,0	80	35—70	
Kandiszucker III	2,0	100	35	
Chloralhydrat	1,5	40	?	
Photoemulsion (nicht belichtet und belichtet und entwickelt)	1,9	30	—	
Bakelitartiges Kunstharz	1,9	52	—	
Plattenglas	1,3	950	—	

3. Der Einfluß der Oberflächenbearbeitung beim normalen Schleif- und Poliervorgang hat sowohl Härtezunahme als auch Härteabnahme zur Folge. Eine allgemeine Voraussage, wann Zu- und wann Abnahme eintritt, kann noch nicht gegeben werden.

III. Molekülbindung.

1. Die auftretenden Streuungen auf natürlichen Flächen sind sehr groß und liegen mit im Mittel $\pm 30\%$ noch über der Streuung bei den Ionenkristallen. Ein gewisser Teil der größeren Streuungen könnte in den häufig schwer auszumessenden Eindrücken gesucht werden, doch kann das allein die größere Streuung nicht erklären. Möglicherweise liegen bei diesen Kristallen stärkere Baufehler vor oder die bereits erwähnte Möglichkeit von Reaktionen mit der umgebenden Atmosphäre (Hydratisierung, Karbonatisierung) spielen in bestimmten Fällen eine Rolle. Schließlich müßte man bei sehr niedrig schmelzenden Stoffen an einen gewissen Einfluß der Erwärmung durch die Mikroskopbeleuchtung denken, obwohl dieser Einfluß bei den vorliegenden Untersuchungen nicht gefunden werden konnte.

2. Die Beziehung zwischen Mikrohärte und *Meyer*-Exponent ist bei den bisher untersuchten Stoffen mit Molekülbindung ziemlich unsicher und es kann heute noch keine endgültige Aussage gemacht werden. Man findet bei den weichen Stoffen (Mikrohärten um 10 kg/mm²) Werte von n über 2, mit steigender Härte von 50 bis 100 kg/mm² Werte praktisch um 2. Anderseits weist der sehr niedrige Wert des Chloralhydrats darauf hin, daß bei dieser Bindungsart unter Umständen andere Beziehungen zwischen n und der Mikrohärte gelten, doch ist es beim jetzigen Stand der Versuchsergebnisse praktisch noch zu früh, weitere Aussagen machen zu wollen.

3. Störungsfreies Ablösen der natürlichen Oberfläche ergibt meist Mikrohärteabnahme, Schleifen meist Zunahme. Weitere Versuche sind nötig.

Amorphe Körper.

1. Bei den amorphen Substanzen, über die bisher nur einige wenige eigene Messungen vorliegen, kann auch auf Grund anderer Untersuchungen gesagt werden, daß die Streuungen im allgemeinen scheinbar verhältnismäßig klein sind.

2. Die Beziehung zwischen Mikrohärte und *Meyer*-Exponent n scheint ebenfalls ähnlich zu verlaufen, wie bei den Metallen und Ionenkristallen.

3. Über den Einfluß des Schleif- und Poliervorganges liegen noch zu wenig Versuchsergebnisse vor.

Schlußwort.

Wegen der großen theoretischen und praktischen Bedeutung des „Härte"-Problems an sich sei noch einmal ausdrücklich darauf verwiesen, daß es sich im vorstehenden nur um die Einkristall-Mikrohärte handelt und daß Schlüsse auf die „Härte" des Kristallhaufwerkes aus den wiedergegebenen Erkenntnissen nicht zulässig sind.

Weiters sei noch darauf verwiesen, daß außer der heutigen Art der Auswertung noch andere Möglichkeiten, z. B. die Gegenüberstellung von elastischem und plastischem Anteil bei der Eindruckbildung u. a. vorliegen.

Zusammenfassung.

Die Mikrohärtemessung ist bei geeigneter Wahl der Prüfbedingungen zur Identifizierung von Stoffen beliebiger Bindungsart anwendbar und gestattet die Prüfung von Einzelteilchen oder Bereichen mit linearen Ausdehnungen bis herab zu 5 bis 10 μ.

Für die Ermittlung der auch nach den vorliegenden Untersuchungen durchaus möglichen Zusammenhänge (z. B. Flächen mit rein elastischer Verformung zunehmend in der Reihenfolge: Metallische-, Ionen-, Molekülbindung), zwischen Mikrohärte und Bindungsart (z. B. in der $\log P - \log d$-Kurve), müssen Messungen an ungestörten Flächen in noch viel größerer Zahl durchgeführt werden.

Die gemeinsame Angabe von Mikrohärte und *Meyer*-Exponent n ist zu empfehlen.

Bei der Untersuchung von Anschliffen, die zunächst als wichtigste Untersuchungsobjekte in Frage kommen, sind die Ergebnisse der Mikrohärteprüfung von folgenden Faktoren maßgeblich beeinflußt:

a) Die relative Größe der Änderung der „wahren" Mikrohärte durch den Schleif- und Poliervorgang.

Ausschaltung dieses Einflusses durch gewaltloses Ablösen der gestörten Oberflächenschicht durch Entfernen einzelner Atome oder Moleküle (z. B. elektrolytisches Polieren, chemische Ablösung der Oberfläche).

b) Orientierungseinfluß.

Ausschaltung nur nach Kenntnis dieses Einflusses und Lage der geprüften Fläche möglich.

c) Größe des Streubereiches.

Ausschaltung durch Aufnahme mehrerer Meßreihen und Mittelwertbildung.

Trotz dieser und einer größeren Zahl anderer Einflüsse, die aber leicht gleich gehalten werden können, wie Belastungsgeschwindigkeit und Belastungszeit, Prüftemperatur, Erschütterungen usw., ist die Mikrohärteprüfung in ihrer heutigen Form und Auswertungsart bei

Metallen ein vollwertiges Identifizierungsverfahren, bei

Körpern mit Ionenbindung ein weitgehend brauchbares Hilfsmittel (so wird z. B. der Bereich 1 bis 9 der *Mohs*-Skala in einen Bereich von 2 bis 2000 kg/mm² unterteilt), bei

Stoffen mit Molekülbindung ein zwar wegen der größeren Streuung etwas grobes, aber vielfach schon direkt anwendbares Verfahren, das zunächst besonders für Differentialdiagnosen brauchbar ist, während für genauere Absolutwertermittlungen noch mehr Versuchsunterlagen gesammelt werden müssen.

Summary.

If the test conditions are properly selected, the micro-determination of hardness may be applied to the identification of materials of any type of binding, and it permits the testing of single particles or ranges with linear dimensions down to 5—10 μ.

For the determination of the relationships which according to the present investigations are entirely possible (e. g., surfaces with pure elastic deformation increasing in the order: metal-, ions-, molecular binding) between micro-hardness and type of binding (e. g., in the log P — log d curve) require measurements in much greater numbers on undisturbed surfaces.

The joint statement of micro-hardness and *Meyer* exponent n is recommended.

In the investigations of polished sections, which are the most important subjects of study, the results of the micro-hardness test are decisively influenced by the following factors:

a) The relative extent of the change of the "true" micro-hardness through the sectioning and polishing process. Elimination of this effect through gentle solution of the disturbed surface layer by removal of separate atoms or molecules (e. g. electrical polishing, chemical solution of the surface).

b) Orientation influence. Elimination possible only after recognition of this influence and location of the tested surface.

c) Extent of the deviation range. Elimination by taking several series of measurements and striking the mean.

Despite these and numerous other influences, which however are easily kept the same, such as loading rate and loading time, temperature of the test, shocks, etc., the micro-hardness test in its present form and mode of application provides a satisfactory identification procedure for *metals*, and an aid of considerable usefulness for *compounds with ionic binding* (e. g. the region 1—9 of the *Mohs* scale is divided into a range of 2 —2000 kg/mm²); for *compounds with molecular binding*, it provides a procedure, which though somewhat rough because of the greater deviation, is widely applicable direct, and which is particularly useful for differential diagnoses. Absolute determinations will require the assembling of still more experimental evidence.

Résumé.

La mesure de micro-dureté est, par un choix convenable des conditions d'essai utilisable pour l'identification des modes de liaison quelconque des substances et permet la distinction de particules isolées ou associées avec la dilatation linéaire jusqu'à 5—10 μ.

Pour la recherche de la connexité possible, d'après les expériences présentes (p. ex. facettes avec configuration élastique pure dans l'ordre: liaisons métalliques, ioniques, moléculaires), les mesures doivent être exécutées entre la micro-dureté et le mode de liaison (par exemple sur la courbe log P, log d) en beaucoup plus grand nombre sur les facettes non altérées.

On recommande l'indication commune de la micro-dureté et de l'exposant n de *Meyer*.

Au cours des expériences sur l'éclat qui peuvent souvent venir en question comme objet principal d'investigation, les résultats des essais de microdureté sont influencés d'une façon importante par les facteurs suivants:

a) la grandeur relative de l'altération de la micro-dureté «vraie» par le procédé de la taille et du polissage. Elimination de cette action par attaque douce de la couche superficielle altérée en eliminant des atomes ou des molécules isolées (p. ex. polissage électrolytique, attaque chimique de la surface).

b) Influence de l'orientation. Elimination possible seulement après connaissance de cette influence et position des facettes essayées.

c) Etendue du domaine de diffusion. Elimination par plusieurs séries de mesures et prise de la moyenne. A cause de cela et d'un grand nombre d'autres influences qui, cependant, peuvent être facilement arrêtées, comme la vitesse et la durée de la charge, la température de l'essai, les vibrations, etc. l'essai de micro-dureté, sous sa forme actuelle, est utile pour les *métaux*, comme procédé d'identification précieux, pour les *corps avec liaison ionique* où il donne un procédé largement utilisable (ainsi le domaine de 1 à 9 de l'échelle de *Mohs* est partagé dans un intervalle compris entre 2 et 2000 kg/mm²). Pour les *substances avec liaison chimique*, l'essai donne un procédé directement utilisable, grossier à cause de la grande dispersion, mais particulièrement utile pour la diagnose différentielle, tandis que pour les déterminations précises, absolues, il faut rassembler encore plus de bases expérimentales.

Diskussion.

H. *Ruziczka* (Wien, Österreich): Wäre es nicht sehr interessant, den Härtungsvorgang von Resolharzen nach dem beschriebenen Verfahren zu prüfen, da Zahnräder aus Hartgewebe oft in gleicher Weise beansprucht werden wie Zahnräder aus Metall?

H. Prof. *Mitsche*: Sicherlich! Wir haben verschiedene Faserstoffe untersucht und glauben ganz sicher, daß auch der Härtungsvorgang von Resolharzen sehr leicht und genau durch Mikrohärteprüfung zu erfassen ist.

H. Prof. *Hüttig* (Graz, Österreich): Ich glaube, daß die derzeitigen theoretischen und experimentellen Grundlagen in der Behandlung des Härteproblems — nicht zuletzt dank der intensiven und erfolgreichen Arbeiten der Leobener Schule — allmählich an den Grenzen ihrer Leistungsfähigkeit anlangen werden. Die Veränderungen, wie sie ein fester Körper durch die untereinander sehr verschiedenartigen Verfahren der Härteprüfung erleidet, einerseits, die Vorgänge, welche die verschiedenen Prüfungen der Festigkeit (insbesondere der Zerreißfestigkeit) einschließlich aller mechanischen Zerkleinerungsvorgänge beinhalten, anderseits, aber auch die Arbeit, welche notwendig ist, um eine Oberfläche zu erzeugen („Oberflächenarbeit", „Oberflächenspannung"), wie auch schließlich die Lösung einer chemischen Bindung innerhalb des Gitters haben eine gemeinsame Wurzel, die auch eine gemeinsame theoretische Behandlung erheischt. Es erscheint verlockend, einem solchen Ziel auf

energetischer Grundlage näherzukommen, das heißt die Energie zu messen, welche zur Erzeugung eines bestimmten Zerstörungseffektes aufgebracht werden muß. Diese Energie besteht aus drei Anteilen: 1. die zur Erzeugung der elastischen Deformation erforderliche Energie; 2. der Energie-Aufwand (= Affinität), welcher bei der Zerstörung zur Überwindung der zwischen den Molekülen herrschenden Bindungskräfte erforderlich ist; 3. die bei dem Vorgang entwickelte Wärme. Natürlich erfordert die experimentelle Behandlung eine Reihe minutiöser Einzelbestimmungen, wie die der Elastizität des Prüfkörpers, die Messung des kalorischen Effektes und die Angabe des Zerstörungseffektes als Anzahl gelöster intermolekularer Bindungen. Für diese Betrachtungsweise wird auch an Stelle des in den physikalisch-chemischen Lehrbüchern allgemein üblichen idealen Gittermodells der Realkristall bzw. das Kristallkonglomerat mit seinem Aufbau aus Mosaikblöckchen und den sonstigen verschiedenartigen Störstellen und den dadurch bedingten verschiedenartigen Bindungsfestigkeiten treten müssen.

Man sage nicht, daß ähnliche Überlegungen schon gemacht wurden. Solche Rückverweisungen sind nicht nur unproduktiv, sondern sie hemmen den Fortschritt. Es kommt doch darauf an, daß der richtige Mann zur richtigen Zeit am richtigen Objekt seine Forschungsarbeit ausführt. (Auch Amerika war vor Columbus ohne praktische Auswirkung entdeckt!) Das richtige Objekt wäre hier ein großes Makro-Objekt mit möglichst einfachen, unkomplizierten Verhältnissen. Im übrigen bedaure ich es sehr, daß ein Altmeister auf dem hier besprochenen Gebiet — unser Kollege *Smekal* — bei der Diskussion nicht anwesend ist.

H. Prof. *Mitsche*: Ohne Zweifel wird letztlich nur eine gesamte Energiebilanz in der Lage sein, das so komplexe Problem der „Härte" auf eine gemeinsame Basis zu bringen, und wir Techniker sehen mit Freude dieser vollständigen Lösung, die wir von den Physikern und Physikochemikern erwarten müssen, entgegen. Wir selbst haben schon vor einigen Jahren einen vielleicht als Zwischenlösung anzusprechenden Weg beschritten, und zwar in der Weise, daß wir zunächst eine rein mechanische Energiebilanz aufstellten: nämlich die Summe der Arbeiten für elastische Verformung, Überwindung der Oberflächenspannung, kristallographisches Gleiten und banales Gleiten einschließlich der Korngrenzenverschiebungen, und daraus eine Beziehung zwischen der Eindruckkraft und der Größe des entstandenen bleibenden Eindruckes ableiteten. Weiters haben wir die Veränderungen der Eindruckhärte der Einzelkristalle und des Kristallhaufwerkes untersucht und auch grundsätzliche Versuche über die Eindringhärte mehr oder weniger loser Pulver angestellt. Leider sind diese Arbeiten, die bei der Internationalen Pulvermetallurgischen Tagung in Graz 1948 vorgetragen wurden, noch immer nicht veröffentlicht, da der Kongressbericht nicht erschienen ist. Wir müssen daher darauf warten, da erst dann die Stellungnahme von anderer Seite möglich sein wird.

Literatur.

[1] *H. Hanemann* und *E. O. Bernhardt*, Z. Metallk. **32**, 35 (1940).

[2] *F. Schulz* und *H. Hanemann*, Z. Metallk. **32** 124 (1941).

[3] *E. O. Bernhardt*, Z. Metallk., **33**, 135 (1941).

[4] *E. M. Onitsch*, Mikroskopie **2**, 131 (1947).

[5] *E. M. Onitsch*, Berg- u. Hüttenm. Monatsh. **93**, 7 (1948).

[6] *H. O. Neill*, The hardness of metals and its measurement. Verlag Chapman & Hall Ltd. London 1934.

[6a] *W. Hengemühle* und *E. Siebel*, Handb. Werkstoffprüf. **2**, 326 (1939) in Berlin.
[7] *H. Tertsch*, Radex-Rundschau 148 (1950).
[8] *E. Meyer*, Forsch.-Arbeiten, Ing. Wesen 65 (1909).
[9] *W. Bischof* und *B. Wenderott*, Arch. Eisenhüttenwesen **13**, 497 (1941/42).
[10] *E. M. H. Lips*, Z. Metallk. **29**, 339 (1937).
[11] *P. Ramsthaler*, Mikroskopie **2**, 345 (1947).
[12] *E. B. Bergsman*, Metall Industrie **69**, Nr. 6, 109 (1946).
[12a] *E. B. Bergsman*, Schweizer Arch. f. angew. Wissensch. u. Techn. **14**, Heft 10, 6 (1948).
[12b] *E. B. Bergsman*, Mikrochem. **36/37**, 831 (1950).
[13] *E. W. Taylor*, J. Institute of Metals **74**, 493 (1948).
[14] *H. Bückle*, Zeissnachrichten, 5. Folge. Z. Metallk. **34**, 130 (1942).
[15] *H. Bückle*, Mikroskopie **4**, 183 (1949).
[16] *R. Mitsche*, Österr. Chem.-Ztg. **49**, 186 (1948).
[17] *E. M. Onitsch*, Österr. Chem.-Ztg. **49**, 186 (1948).
[18] *E. M. Onitsch*, Berg- u. Hüttenm. Monatsh. **93**, 7 (1948).
[19] *R. Mitsche* und *E. M. Onitsch*, Mikroskopie **3**, 257 (1948).
[20] *H. Raether*, Mikroskopie **5**, 101 (1950).
[21] *R. D. Heidenreich*, SAE Journal **53**, 588 (1945).
[22] *K. H. Leise*, Z. Metallforsch. **2**, 111 (1947).
[23] *H. Raether*, C. r. acad. sci., Paris **227**, 1247 (1948).
[24] *H. Raether*, Nature **161**, 311 (1948).
[25] *H. Tertsch*, Mikroskopie **5**, 172 (1950).
[26] *A. Smekal*, Metallwirtschaft **11**, 551 (1932); **16**, 189 (1937); Ergeb. exakt. Naturwiss. **15**, 106 (1936); Z. Kristallgr. **89**, 386 (1934); Z. Phys. **103**, 495 (1936).

Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie de Paris.

Semimicrodosage de l'acide glycolique libéré au cours des oxydations périodiques.

Par

Paul Fleury, Jean Courtois et **Roland Perlès.**

(Reçu le 18 juillet 1950.)

L'un des principaux avantages que présente l'acide periodique sur le tétracétate de plomb est la possibilité d'identifier et parfois de doser certains corps à un ou deux atomes de carbone résultant de la réaction. Les deux oxydants attaquent sensiblement les mêmes corps mais l'acide periodique oxyde beaucoup plus lentement que le tétracétate de plomb certains produits intermédiaires de la réaction comme les acides formique — oxalique — glycolique.

L'acide glycolique n'est que très lentement et incomplétement oxydé par l'acide periodique (*Fleury, Poirot* et Mme *Fiévet*[5, 8]). Il a ainsi été possible d'identifier l'apparition d'acide glycolique après action de l'acide periodique sur divers corps:

fructose (*Fleury* et *Lange*[7], *Khouvine* et *Arragon*[9])

acide fructose-6-phosphorique (ester de Neuberg) (*Courtois* et *Ramet*[2])

maltose et lactose (*Courtois* et *Ramet*[1, 3])

inositol (*Fleury, Poirot* et Mme *Fiévet*[8]).

Il nous a paru intéressant de chercher à déterminer cet acide glycolique pour doser les corps oxydables d'une façon plus spécifique que la simple détermination de l'acide periodique réduit.

Nous avons pu observer que l'acide glycolique chauffé à la température du bain-marie bouillant avec une solution sulfurique d'acide chromotropique développe une teinte violet permanganate. Cette coloration se rapproche de celle obtenue à froid avec le formaldéhyde (*Eegriwe*[4]).

Nous avons cherché à préciser la spécificité de cette réaction en chauffant à 100° quelques milligrammes de divers corps avec 0,5 ml de solution aqueuse d'acide chromotropique à 5% et 5 ml d'acide sulfurique concentré. Les acides formique, acétique, oxalique et citrique ne fournissent aucune coloration, l'acide lactique conduit à une teinte rose puis

jaune pour des concentrations élevées. La couleur est verte avec l'acide tartrique, jaune avec fluorescence verte pour l'acide malique.

L'éthylèneglycol donne une très faible teinte rose, le propylèneglycol et le glycérol des teintes jaunes. Il convient de remarquer, qu'à l'exclusion du formaldéhyde, tous les corps conduisant à l'apparition d'une coloration sont oxydables par l'acide periodique et ne peuvent donc interférer dans le dosage de l'acide glycolique formé par oxydation periodique.

Nous avons observé qu'il était possible d'utiliser cette réaction colorée pour le dosage de l'acide glycolique; nous chauffons au bain-marie bouillant pendant 20 minutes 0,5 ml de solution d'acide glycolique ne contenant pas plus de 1,2 mg par ml, 0,5 ml de solution aqueuse fraichement préparée d'acide chromotropique à 5% et 5 ml d'acide sulfurique concentré privé de substances nitreuses. Nous laissons alors refroidir et procédons au dosage colorimétrique avec l'électrophotomètre de *Meunier*, écran vert n° 52. Pour les colorations trop intenses nous diluons avec l'acide sulfurique 2 N.

L'intensité de la teinte est à peu près directement proportionnelle à la concentration de l'acide glycolique; il est cependant préférable de se rapporter à une courbe d'étalonnage.

Nous avons alors procédé au dosage de l'acide glycolique ajouté au mélange résultant de l'oxydation periodique d'une substance non génératrice de formaldéhyde; notre choix s'est porté sur l'acide malonique (*Fleury* et *Courtois*)[6]. Il est indispensable d'éliminer l'acide periodique en excès et l'acide iodique qui a pris naissance; ces deux acides, de même que d'autres oxydants (nitrates, etc.), entravent la réaction colorée, il se développe des teintes parasites brun rouge virant au violet en milieu alcalin.

Après divers essais préliminaires, nous avons adopté le protocole opératoire suivant:

Oxydation par une solution aqueuse d'acide periodique dépourvue de sels; élimination de l'excès d'acide periodique et de l'acide iodique en neutralisant par de l'eau de baryte. Le précipité formé est éliminé par filtration puis lavé par 2 à 3 ml d'eau distillée.

Une faible proportion des dérivés oxygénés de l'iode demeure en solution; nous les réduisons par addition d'une solution de sulfite neutre de sodium à 2% versée goutte à goutte et en agitant, ceci après avoir acidifié le filtrat par 1 ml d'acide sulfurique 2 N. Le terme de la réaction est indiqué par la décoloration exacte de l'iode qui s'est libéré au début.

L'acide iodhydrique formé est éliminé par addition de solution d'acétate d'argent à 0,50% jusqu'à ce que le liquide surnageant ne précipite plus par affusion de solution argentique.

Nous filtrons, lavons le précipité à l'eau distillée pour amener le filtrat à un volume connu. Le dosage colorimétrique est réalisé sur des prises d'essai de 0,5 ml de ce filtrat ou de sa dilution.

Nous avons appliqué cette technique à des mélanges obtenus en ajoutant de l'acide glycolique à un mélange d'acide malonique et d'acide periodique, demeurés préalablement 24 heures en contact. Voici quelques-uns des résultats obtenus:

Acide glycolique ajouté (en γ par ml)	Acide glycolique dosé (en γ par ml)	Erreur %
608	583	— 4,1
760	735	— 3,2
1064	1012	— 4,8

Un certain nombre d'autres déterminations nous ont permis de confirmer qu'il était ainsi possible de doser l'acide glycolique avec une erreur par défaut inférieure à 5%. Nous poursuivons ces essais avec les corps libérant de l'acide glycolique par oxydation periodique.

Résumé.

L'acide glycolique chauffé avec l'acide chromotropique en milieu sulfurique développe une teinte violette permettant un dosage colorimétrique régulier. Nous décrivons un protocole opératoire applicable aux milieux résultant d'une oxydation périodique.

Zusammenfassung.

Glykolsäure gibt beim Erwärmen mit Chromotropsäure in Gegenwart von Schwefelsäure eine Violettfärbung, mit deren Hilfe ihre kolorimetrische Bestimmung möglich ist. Es wird eine Arbeitsvorschrift mitgeteilt, die diese Reaktion für Glykolsäure-Lösungen anwendbar macht, die durch Oxydation mit Perjodsäure erhalten werden.

Summary.

The violet color, which develops when glycolic acid is warmed with chromotropic acid in the presence of sulfuric acid can be used for the colorimetric determination of glycolic acid. A procedure is given for applying this reaction to solutions of glycolic acid obtained on oxydation by means of periodic acid.

Bibliographie.

[1] *J. Courtois*, Bull. soc. chim. biol. **29**, 248 (1947).
[2] *J. Courtois* et *M. Ramet*, Bull. soc. chim. France **11**, 539 (1944).
[3] *J. Courtois* et *M. Ramet*, Bull. soc. chim. biol. 29, 240 (1947).
[4] *E. Eegriwe*, Z. analyt. Chem. **110**, 22 (1937).
[5] *Mme Y. Fiévet-Guinard*, Th. Doct. Univ. Pharm. Paris 1945.
[6] *P. Fleury* et *J. Courtois*, Bull. soc. chim. France, **14**, 358 (1947).
[7] *P. Fleury* et *J. Lange*, J. pharm. et chim. **17**, 409 (1933).
[8] *P. Fleury*, *G. Poirot* et *Y. Fiévet*, C. R. acad. sci., Paris **220**, 664 (1945) et Ann. pharm. Fr. **5**, 209 (1947).
[9] *Y. Khouvine* et *G. Arragon*, Bull. soc. chim. France **8**, 676 (1941).

Aus dem Hygienischen Institut der Technischen Hochschule Dresden.

Mikrodokimastische Bestimmungen zur Oligodynamie des Silbers.

Von

Karl Süpfle † und Rudolf Werner*.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 18. Oktober 1950.)

Seit den grundlegenden Beobachtungen von *C. Nägeli*[1] in den Achtzigerjahren des vorigen Jahrhunderts ist die sog. oligodynamische Metallwirkung vielfach studiert worden. Insbesondere war man bemüht, die zunächst rätselhaften Erscheinungen der Oligodynamie theoretisch zu erforschen und klarzulegen. Die meisten Autoren kamen zu dem Schluß, daß die Oligodynamie eine Funktion der Metallionen sei.

Da bestimmte Metallionen imstande sind, Bakterien zu töten, lag es nahe, die desinfizierende Wirkung geeigneter Metalle bzw. Metallsalze praktisch zu verwerten. Schon in früheren Jahren ist der Vorschlag aufgetaucht, Trinkwasser auf diese Art von Krankheitserregern zu befreien; es sei hingewiesen auf *Kraemer*[2] und *P. Saxl*[2]. Größere Beachtung fand der Gedanke, Wasser durch Metallionen zu entkeimen, aber erst, als *G. A. Krause*[4,5] neue technisch interessante und aussichtsvolle Verfahren („Katadynsilber") ausarbeitete und bekanntgab. Von verschiedenen Seiten sind die Angaben *Krauses* über sein Verfahren der „Wassersterilisierung" nachgeprüft worden (*R. Degkwitz*[6], *F. Konrich*[7,8], *W. Olszewski*[9], *H. Gottschalk*[10] u. a.); es wird diskutiert, Silber zu verwenden zur Entkeimung von Trinkwasser, zur Konservierung von Lebensmitteln, zur Sterilisierung pharmazeutischer Präparate, zur Behandlung des Wassers öffentlicher Schwimmbäder, zur Waschung und Befeuchtung von Luft u. dgl.

Im Anschluß an experimentelle Untersuchungen, die seit 1920 von *K. Süpfle*[11-14] und seinen Mitarbeitern (*A. Streck*[15], *H. Rosen-*

* Derzeit Düsseldorf, Chemisches Untersuchungsamt des Landkreises, Kasernenstraße 69.

kranz[16], *P. Hofmann*[17]) über die oligodynamische Metallwirkung auf Bakterien angestellt worden sind, haben wir Versuche[18] zur praktischen Verwertbarkeit der Silberwirkung zur Wasserentkeimung während zweier Jahre durchgeführt.

1. Methodik der bakteriologischen Untersuchungen.

Bei der Prüfung der bakterientötenden Wirkung der Katadynpräparate bzw. des gesilberten Wassers kam es darauf an, Wasser mit bekannten Bakterienmengen zu versetzen.

Gemessene Mengen von Wasser wurden mit abgestuften Mengen einer passenden Bakteriensuspension vermischt, deren Keimgehalt gleichzeitig festzustellen war. Proben des derart infizierten Prüfungswassers wurden nach den in Betracht kommenden Zeiträumen mit einer Öse von 30 mg Inhalt entnommen und zur Keimzahlbestimmung auf der Oberfläche von Agarplatten ausgestrichen. Aus den nach der Bebrütung aufgegangenen Kolonien konnte die Zahl der noch im Prüfungswasser lebend verbliebenen Keime ermittelt werden.

Zur Herstellung und Keimgehaltsbestimmung der verwendeten Bakteriensuspension verfuhren wir in der im Institut üblichen Weise folgendermaßen. Wir verrieben den Inhalt einer mit 18- bis 24stündiger Schrägagarkultur gefullten 3 mg-Öse in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung. 1 ml dieser Suspension wurde in einem zweiten Reagenzglas mit 9 ml physiologischer Kochsalzlösung verdunnt, so daß in diesem Glase nur noch $^1/_{10}$ Öse Kulturbelag vorhanden war; entsprechend wurde weiter verfahren, bis ein letztes Röhrchen nur noch $^1/_{1000000}$ Öse enthielt. Den so hergestellten Verdünnungen wurde je eine 30 mg fassende Öse entnommen und auf passend getrockneten Agarplatten gleichmaßig verteilt. Die Platten wurden dann 24 Stunden lang im Brutschrank bei 37° gehalten und ausgezählt. Man findet nun auf einer der beimpften Platten eine gut zählbare Menge von Kolonien. Daraus errechnet man den Keimgehalt der verwendeten Bakteriensuspensionen.

Bei den Bakterizidieversuchen wurden jeweils 5 ml ungesilberten Wassers, das im übrigen die gleiche chemische Zusammensetzung aufwies und mit derselben Keimmenge wie das silberhaltige Wasser beimpft worden war, als Kontrolle in den Versuch gestellt. Die Keimzahlbestimmung in den Versuchsröhrchen erfolgte zumeist stundenweise.

2. Methodik der chemischen Untersuchungen.

Die geringen Silbergehalte oligodynamisch behandelter Lebensmittel, wie Trinkwasser[19], Wein, Essig[20], Fruchtsäfte u. a. werden für gewöhnlich kolorimetrisch nach *Feigl* mit p-Dimethylaminobenzylidenrhodanin oder potentiometrisch bestimmt. Beide Methoden können nicht als *absolut* spezifisch bezeichnet werden.

Auf Grund zahlreicher Vorversuche entschieden wir uns schließlich für die Mikrobestimmung des Silbers nach *F. Haber*[21]. Hierbei wird das vorhandene Silber durch kolloidal verteiltes Bleisulfid adsorbiert und mit dem Koagulum niedergeschlagen. Das nunmehr silberhaltige Bleisulfid wird in geeigneter Weise abzentrifugiert und der üblichen

Probieranalyse unterworfen. Schließlich wird das erhaltene Silberkorn zur Kugel geschmolzen und unter dem Mikroskop gemessen.

Der Vorzug dieses Verfahrens besteht in der Spezifität der dokimastischen Methode, d. h. das vorhandene Silber wird als solches nachgewiesen. Allerdings können auch hier zwei Fehlerquellen störend einwirken, nämlich der unter Umständen nicht unbeträchtliche Edelmetallgehalt unpräparierter Reagenzien (positiver Fehler), ferner die relativ hohe Flüchtigkeit und Schlackenlöslichkeit des Silbers (negativer Fehler).

Wie die Arbeiten von *Berndt*[22] und *J. Rabinowitsch*[23] aus dem *Haber*schen Institut dartun, ist es möglich, die durch Schlackenlöslichkeit bedingten Silberverluste in mäßigen, bekannten Grenzen zu halten; *J. Rabinowitsch* ist es gelungen, die zur Probieranalyse[24] notwendigen Bleisalze und Zuschläge bis weit unter die Fehlergrenze der ganzen Methode edelmetallfrei darzustellen. Die *Haber*sche Methode gestattet dem geübten Untersucher bei Einhaltung aller von *Berndt* und *Rabinowitsch* mitgeteilten Vorschriften den Nachweis von 1 γ Silber. Allerdings beträgt bei so außerordentlich geringen Silbermengen von 1 oder wenigen γ die Fehlerbreite 20 bis 50%.

Zur Prüfung der *Haber*schen Methode gingen wir von einer n/1000 Silbernitratlösung aus, die aus redestilliertem Wasser und chemisch reinem Silbernitrat unter Zusatz überschüssiger chemisch reiner 65%iger Salpetersäure bereitet worden war.

Es wurden abgestufte Mengen der verdünnten Stammlösung (1,1 γ Silber pro ml) in sogenannte Spitzgefäße (Glasfläschchen mit konischem Oberteil, lichter Weite der Öffnung 9 mm, Inhalt zirka 25 ml) eingewogen. Mit 1,0 ml einer 10%igen, nach *Rabinowitsch* edelmetallfrei hergestellten Bleiacetatlösung und 10 ml einer frischen Ammoniumsulfidlösung wird ein feinteiliges Koagulum von Bleisulfid erzeugt. Den entstehenden Niederschlag läßt man während einiger Stunden absitzen, hierauf wird das Gefäß bis zum Rande mit redestilliertem Wasser aufgefüllt. (Flottierende Sulfidhäutchen werden durch einige Tropfen Alkohol niedergeschlagen!) Auf den Hals des Spitzgefäßes *a* wird eine konzentrisch durchlochte Hartgummischeibe *b* gestülpt, die einen 4 cm hohen, wassergefüllten Glaszylinder *c* trägt. Dann wird ein an den Rändern mit Vaseline eingefetteter Schmelztiegel *d* in den Zylinder eingebracht, das ganze System bis zum Rande mit redestilliertem Wasser aufgefüllt und der eingefettete Tiegelrand unter sorgfältiger Vermeidung des Eindringens von Luftblasen an die Gummiplatte gedrückt. Nach dieser Operation wird der aufgesetzte Glaszylinder abgestreift, das Spitzgefäß samt Tiegel und Gummiplatte vorsichtig umgedreht und in einen passenden Halter eingesetzt. Der Tiegel sitzt jetzt aufrecht in dem ringförmigen Hartgummieinsatz *e* des Halters, die Ausflußöffnung des Spitzgefäßes liegt wenige Millimeter unterhalb der Ränder des nunmehr vollständig wassergefüllten Tiegels. Der Halter wird nun in den Zentrifugenbecher eingesetzt, dieser mit Wasser gefüllt und gegen eine andere gleiche Anordnung sorgfältig mit Wasser austariert. Beide Becher werden dann bei zirka 3500 Touren/Minute mindestens 1 Stunde lang zentrifugiert. Nach beendigtem Zentrifugieren wird der festanhaftende Tiegel vorsichtig abgelöst, um ein

Aufrühren des nunmehr silberhaltigen Bleisulfidniederschlages zu verhindern. Die überstehende restliche Ammoniumsulfidlösung wird an einem Glasstab vorsichtig abgegossen. Der Sulfidniederschlag wird, nachdem er trocken ge-

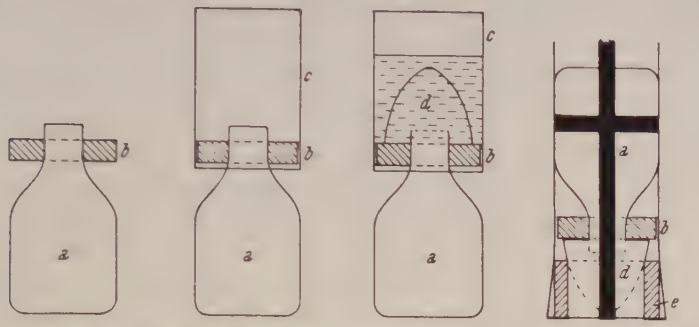


Abb. 1. Auszentrifugieren silberhaltiger Bleisulfidniederschläge nach *Haber* und *Rabinowitsch*. *a* Spitzgefäß, *b* Gummischeibe, *c* Glaszylinder, *d* Schmelztiegel, *e* Gummidämpfung des Halters (4/9 der nat. Größe).

worden ist, zur Vermeidung unerwünschter Porzellankorrosion im vorher gewaschenen, durch Watte filtrierten Wasserstoffstrom reduziert. Nach dem Abkühlen fügt man zirka 1 g nach *Rabinowitsch* edelmetallfrei hergestelltes Bleiformiat zu und erzeugt im zugedeckten Tiegel einen Regulus. Dann wird mit zirka 1 g edelmetallfreier Borsäure angesotten und so langsam als möglich bis zum hirsekorngroßen Regulus abgetrieben. Der Regulus samt einhüllender Schlacke wird in eine bereitgehaltene Porzellankupelle ausgegossen, der Regulus mit der Kornzange von der anhaftenden Schlacke befreit und über der Bunsenflamme bis zum Blicken feingetrieben. Nach dem Verschwinden des Regulus wird die Kupelle durch Aufblasen von Luft auf die Unterseite des Schälchens gekühlt, der Schlackenhof paraffiniert und auf die paraffinfreie Silberperle ein Tropfen Flußsäure gebracht. Nach einigen Stunden kann die gelockerte Perle an einem eingefetteten Roßhaar aus der Schlackengrube herausgezogen werden. Man legt sie zweckmäßig auf ein feuchtes Fließpapier von etwa 1 mm² Fläche.

Tabelle 1. Versuche zur Ermittlung des Silbergehaltes nach der *Haber*schen Methode.

Einwaage Ag in γ	Auswaage Ag in γ	Fehler in %
11,23	9,61	— 14,4
11,26	6,00	— 45,9
8,89	8,08	— 9,1
8,90	9,45	+ 6,2
6,64	4,30	— 35,2
6,69	3,63	— 45,7
4,51	5,19	+ 15,1
4,50	4,14	— 8,0
2,21	1,66	— 24,9
1,12	1,09	— 2,5
1,13	1,00	— 12,4
1,10	0,72	— 26,6

Inzwischen hat man an ein Magnesiastäbchen eine Borsäureperle blasenfrei angeschmolzen. Silberperle und Fließpapier werden auf die erkaltete Borsäure übertragen und mit dem Lötrohr vorsichtig angeblasen. Wenn das Papier vollständig verascht ist, überzeugt man sich mit einer starken Lupe von dem Vorhandensein der jetzt rundgeschmolzenen Silberperle, kneift mit der Zange das Ende des Magnesiastäbchens ab und bringt dieses in den Hohlschliff

eines Objektträgers. Die Borsäure wird in einigen Tropfen Wasser aufgelöst und die restliche Magnesia entfernt. Der Objektträger wird vorsichtig über einer Gasflamme erhitzt. Die freigelegte Perle wird mit Alkohol gewaschen und ist dann zum Messen fertig. Man bettet sie zweckmäßig in einen Tropfen Kanadabalsam ein und gibt ein Deckglas darüber. Ihr Durchmesser wird mehrmals mit einem geeichten Okularmikrometer bestimmt und der Mittelwert errechnet. Aus dem spezifischen Gewicht gegossenen Silbers (= 10,48) und dem ermittelten Durchmesser der Silberperle kann das Gewicht der erhaltenen Ag-Menge bestimmt werden.

In Tabelle 1 haben wir einige Versuche niedergelegt, die wir mit der 1,1 γ Ag/ml enthaltenden Stammlösung ausgeführt haben.

Es ist ersichtlich, daß bei der gewählten Einwaage von 1 bis 11 γ Silber Fehler bis zu 45% auftreten können und daß der Fehler fast immer negativ ist; d. h. daß die Analyse in der Regel zu niedrige Werte ergibt. Trotzdem möchten wir die *Haber*sche Methode als die bisher geeignetste zum Nachweis so kleiner Silbermengen ansprechen.

Bei der Aufgabe, in allen interessierenden Fällen unserer Versuchsreihen den Silbergehalt zu ermitteln, gingen wir so vor, daß wir 1000 ml des zu untersuchenden Wassers auf dem Wasserbad bis zu einem Volumen von zirka 25 ml einengten. Mit diesem Material wurde in der beschriebenen Weise die Bestimmung nach *Haber* ausgeführt. Bei der Darstellung der Ergebnisse wird der Silbergehalt in γ pro Liter angegeben, und zwar als abgerundeter Mittelwert aus mehreren Bestimmungen.

Versuchsergebnisse.

1. Entkeimung bakterienhaltigen Wassers durch Aufbewahrung in Katadyn-Flaschensterilisatoren.

Um die entkeimende Wirkung der Silberung zu prüfen, die beim Stehen von Wasser in Katadynflaschensterilisatoren erfolgt, haben wir zunächst eine Reihe von Versuchen mit Leitungswasser angestellt. Da das Dresdner Leitungswasser infolge der Behandlung, die es zentral erfährt, sehr bakterienarm ist, haben wir es mit Reinkulturen infiziert, um deutliche Ausschläge zu erhalten. Es wurden verschiedene Bakterienarten herangezogen. Wir überzeugten uns, daß z. B. Bact. coli, Bact. prodigiosum und Staphylokokken im Wasser nach mehrstündigem Stehen in den silberhaltigen Flaschen abgetötet werden.

Es sei betont, daß die entkeimende Wirkung der Silberionen gegenüber verschiedenen Bakterienarten durchaus ungleich intensiv ist. Dementsprechend ist auch das Katadynverfahren nicht imstande, in einer bestimmten Zeit, in der hinfällige Arten absterben, alle Bakterien überhaupt abzutöten. Daß sporenbildende Bakterienarten in der Sporenform wochenlang in gesilbertem Wasser lebensfähig bleiben, haben wir an dem Beispiel der Mesentericussporen verfolgt.

Unter drei Stämmen des Bact. mesentericus der Institutssammlung wählten wir den Stamm aus, der am besten sporulierte. Wir hielten Agarkulturen dieses Stammes so lange bei 37°, bis die Versporung vollständig eingetreten war. Die versporten Kulturbeläge schwemmten wir mit Leitungswasser derart ab, daß eine ziemlich dichte Suspension entstand. Es wurden nun 270 ml Leitungswasser mit 30 ml Suspension versetzt. Dieses sporenhaltige Leitungswasser brachten wir in einen *Erlenmeyer*-Kolben, der 200 g Katadynquarzsand (10% Ag) enthielt. Zur Kontrolle stellten wir 270 ml Leitungswasser mit Zusatz von 30 ml Sporensuspension in einem gewöhnlichen *Erlenmeyer*-Kolben in den Versuch. Zuerst stündlich, dann täglich und später wöchentlich entnahmen wir Proben und prüften durch Ausstreichen auf Agarplatten die Lebensfähigkeit der Mesentericussporen. Noch nach fünf Wochen dauernder Einwirkung des Katadynquarzsandes erwiesen sich die Mesentericussporen in der Nachkultur als prompt lebensfähig.

Der Befund, daß Sporen den Silberionen lange widerstehen, schließt zwar nicht von vornherein die Möglichkeit aus, daß die Silberung von Trinkwasser praktisch in Betracht kommt; ist ja doch eine Infektion mit pathogenen Sporenträgern durch Wasser nur für Milzbrand und nur bei Tieren beobachtet. Aber dieser Befund ist grundsätzlich insofern wichtig, als er zeigt, daß es nicht angängig ist, von „Sterilisierung" des Wassers oder einer anderen Flüssigkeit durch das Katadynverfahren zu sprechen. Denn der Begriff „Sterilisierung" ist nicht nur im wissenschaftlichen Sprachgebrauch, sondern — und das ist für die Frage der etwaigen Anwendung des Katadynverfahrens in der pharmazeutischen Praxis bedeutungsvoll — auch im Sinne des Deutschen Arzneibuches dahin festgelegt, daß „sterilisieren heißt: einen Gegenstand vollkommen keimfrei machen".

Zu den quantitativen Versuchen, über die wir nunmehr berichten, wählten wir meist Bact. coli als Testkeim, weil dieses Bakterium ein Repräsentant für den Resistenzgrad der bei uns in Betracht kommenden, durch Wasser gelegentlich verschleppbaren Erreger infektiöser Darmerkrankungen ist. Der von uns verwendete Coli-Stamm blieb in 1% Phenollösung 90 Min. am Leben, war also sehr resistent.

Wir versetzten daher Proben von Leitungswasser mit steigenden Keimmengen und verbrachten das keimhaltige Wasser in Katadyn-Flaschensterilisatoren. Es wurde festgestellt, wann die Einsaat abgetötet war. Wie Tabelle 2 zeigt, war die kleine Einsaat von zirka 1500 Keimen (Bact. coli) im ml nach 3 Stunden steril geworden; in der zweiten Probe mit der größeren Einsaat von zirka 18000 Keimen war die Abtötung in 4 Stunden eingetreten; dagegen war die allerdings sehr große Einsaat von 120000 Keimen in 6 Stunden noch nicht voll-

ständig abgetötet worden, sondern erst nach 24 Stunden. Die Abtötung erfolgt also um so später, je größer die Keimmenge ist.

Tabelle 2. Wirkung der Silberung auf Wasser verschieden hohen Keimgehaltes (Katadyn-Flaschensterilisatoren).

Behandlung des Wassers	Einsaat pro ml	Keimzahl pro ml nach Stunden						
		1	2	3	4	5	6	24
Aufbewahrung in Katadyn-Flaschensterilisatoren	1500	90	30	0	0	0	0	0
	18000	3800	1500	150	0	0	0	0
	120000	51000	17400	20000	9100	2600	1100	0
Leitungswasser ungesilbert	18000	18000	18000	18000	18000	18000	18000	12000

2. Bakterizide Wirkung gesilberten Wassers.

Wie *Krause* betont, hat das Katadynverfahren nicht nur den Wert, Wasser während des Kontaktes mit Katadynkörpern von den Keimen zu befreien, die vor der Silberung vorhanden waren, sondern das Wasser auch bakterizid zu machen. Gesilbertes Wasser ist daher imstande, den Zustand der einmal eingetretenen Keimbefreiung auch dann zu bewahren, wenn nach Fortfall des Kontaktes mit Katadyn neuerdings Keime in das Wasser gelangen; wenigstens ist diese Wirkung zu erwarten gegenüber Keimen, die durch Silberionen getötet werden. Die Frage, inwieweit gesilbertes Wasser eine Einsaat von Keimen abzutöten vermag, läßt sich im Experiment quantitativ verfolgen. Wir haben zahlreiche Prüfungen in dieser Richtung durchgeführt.

Als Versuchsbeispiel für die Bakterizidieprüfung von Wasser, das in Katadynflaschensterilisatoren verschieden lange Zeiträume hindurch aufbewahrt worden war, führen wir die in Tabelle 3 wiedergegebene Versuchsreihe an. Es geht daraus hervor, daß Dresdner Leitungswasser schon nach zweistündigem Kontakt mit den Katadynfüllkörpern so viel Silberionen aufgenommen hatte, daß das Wasser eine Einsaat von zirka 18000 Keimen bei Zimmertemperatur nach 4 Stunden abtöten konnte. Betrug die Kontaktzeit 24 Stunden, so war der bakterizide Effekt höher; solches Wasser tötet die Einsaat schon nach 3 Stunden. War das Wasser 2×24 Stunden in den Katadynflaschensterilisatoren gestanden, so wurden die eingesäten Keime nach 2 Stunden abgetötet. Jedoch ist ein

längerer Kontakt mit dem Katadynsilber nicht imstande, den Grad der Bakterizidie noch zu steigern.

Tabelle 3. Bakterizide Wirkung gesilberten Wassers nach abgestuftem Aufenthalt in Katadyn-Flaschensterilisatoren.

Dauer des Aufenthaltes im Katadyn-Flaschensterilisator in Stunden	Einsaat pro ml	Keimzahl pro ml in Stunden							
		1	2	3	4	5	6	7	8
2	18600	1080	120	60	0	0	—	—	—
12	22500	120	90	30	0	0	0	—	—
24	17200	420	90	0	0	0	—	—	—
2×24	10400	180	0	0	0	—	—	—	—
8×24	7700	360	0	0	0	—	—	—	—
Kontrolle	29400	—	—	—	—	—	24000	—	—
ungesilbert	10800	—	—	—	—	—	—	—	9000

Unsere Erwartung, daß die Silberung des Wassers erhöht werden könne, wenn wir das Wasser ausgiebig mit katadynisierten Porzellanringen, Märbel und Quarzsand in der beschriebenen Weise in Kontakt brachten, erfüllte sich auch dann nicht, wenn wir den Aufenthalt auf lange Zeiträume ausdehnten. Selbst nach einmonatigem Kontakt tötete das gesilberte Wasser eine Einsaat von zirka 8000 Keimen nach demselben Zeitraum (2 Stunden) ab, wie ein Wasser, das nur 2 Tage lang katadynisiert worden war. Die chemische Prüfung ergab einen Silbergehalt von zirka 500 γ/l.

Es ist aber hervorzuheben, daß eine Silberung mit 500 γ/l das Wasser befähigt, auch viel größere Einsaaten zu bewältigen, als 10000 Keime; so ist derartiges Silberwasser imstande, 500000 Keime des resistenten, von uns verwendeten Colistammes bei Zimmertemperatur in 3 Stunden abzutöten.

Zur technischen Vereinfachung der Laboratoriumsversuche ist es üblich, die Prüfung der Bakterizidie — wenn nicht besondere Gegengründe vorliegen — bei Zimmertemperatur vorzunehmen. Bei einem Entkeimungsverfahren, das für Trinkwasser in Betracht kommt, ist aber zu berücksichtigen, daß die Abtötung in praxi bei wesentlich niedrigeren Temperaturen zu erfolgen hat. Es interessierte daher, festzustellen, ob die bakterizide Wirkung bei Erniedrigung der Temperatur eine nennenswerte Verminderung bzw. Verzögerung erfährt. Dies ist, wie ein derartiger Versuch (Tabelle 4) erkennen läßt, in der Tat der Fall. Während ein Wasser mit 100 bis 500 γ/l bei 22° eine Einsaat von zirka 12000 Keimen in 4 Stunden vernichtet, vermag es bei 0° in sechs

Stunden noch keine völlige Abtötung herbeizuführen, sondern erst in der Zeit zwischen 6 und 24 Stunden. Dieses Ergebnis lehrt, daß der Temperaturfaktor bei der Gesamtbeurteilung in Rechnung zu ziehen ist.

Tabelle 4. Einfluß der Temperatur auf die Bakterizidie gesilberten Leitungswassers.

Temperatur während der Versuchsdauer	Silbergehalt des Wassers γ/l	Einsaat pro ml	Keimzahl pro ml in Stunden			
			1	4	6	24
22°	500	14000	240	0	0	—
	100	12300	1260	0	0	—
	10	10800	3000	60	0	—
	ungesilbert Kontrolle	24600	25000	15600	16700	—
0°	500	26000	16900	2700	780	0
	100	19000	15000	2500	1500	0
	10	27000	18000	4600	3800	120
	ungesilbert Kontrolle	22000	26000	21000	27000	22000

Es war schon *v. Nägeli* bekannt, daß es eine große Zahl von Stoffen gibt, die die oligodynamische Wirkung hemmen. Wertvolle Studien über die Beeinflussung der Oligodynamie verdanken wir u. a. *Doerr, Spiro, Neißer*[25] und seinen Schülern. Die Hemmung der Oligodynamie beruht je nach den störenden Stoffen auf einer Entionisierung oder auf einer Änderung des physikalischen Gleichgewichtes; Komplexsalzbildungen können eintreten, adsorptive Bindungen, z. B. zwischen Kolloiden und den Silberionen, Adsorptionsverdrängung u. a.

Ein wichtiger Adsorptionsvorgang tritt, wie bereits *v. Nägeli* erkannt hatte, bei der Aufbewahrung oligodynamischer Lösungen ein: die Gefäßwand adsorbiert Metall, so daß sie imstande ist, die Oligodynamie auf neu eingefülltes Wasser zu übertragen. Der Adsorptionsvorgang hat seinerseits eine Rückwirkung auf die oligodynamische Lösung: in dem Maße, als die Gefäßwand Silber adsorbiert, muß die darin aufbewahrte Silberlösung an Wirksamkeit einbüßen. Sehr anschaulich kann man diese Folge in Versuchen beobachten, wie sie Tabelle 5 protokolliert.

Wir beschickten 3 Zentrifugengläser mit je 10 ml Silberwasser (zirka 500 γ/l). Die Versuchsröhrchen wurden mit zirka 500000 Keimen versetzt, aber nicht alle gleichzeitig, sondern derart, daß das erste Gläschen sofort, das zweite nach 24 Stunden, das dritte nach 48 Stunden beimpft wurden. Während die Probe Silberwasser, die unmittelbar nach Ansetzen des Versuches mit Bact. coli besät wurde, so kräftig wirksam war, daß schon nach 3 Stunden die Einsaat abgetötet war, zeigten die übrigen Proben eine Abnahme der bakteriziden Wirkung.

Die Hemmung der Oligodynamie ist die Folge, daß das Silberwasser bei der Berührung mit der Glaswand einen Silberverlust erleidet. Um einen analogen Vorgang handelt es sich bei der Adsorption des Silbers durch große Mengen von Keimen. Man kann die bakterizide Kraft einer Probe Silberwasser dadurch erschöpfen, daß man den Zusatz von Keimen wiederholt.

Tabelle 5. Hemmung der Bakterizidie durch Adsorption von Silber durch die Glaswand.

Dauer des Kontaktes mit der Glaswand in Stunden	Einsaat pro ml	Keimzahl pro ml nach Stunden				
		2	3	4	5	24
0	500000	120	0	0	0	0
24	500000	240	90	30	0	0
48	500000	30000	24000	20000	10000	0

Zur Illustration dieser Tatsache, die insbesondere von *Bail* studiert worden ist, fügen wir einen Versuch (Tabelle 6) bei. Eine stark gesilberte Wasserprobe wurde teils mit geringeren, teils mit größeren Mengen von Bact. coli versetzt. Nach Ablauf von 24, 2×24 und 3×24 Stunden wurden die Keime durch kräftiges Zentrifugieren ausgeschleudert. Der in ein anderes Glas gebrachte Abguß wurde neuerdings mit Keimen besät.

Tabelle 6. Erschöpfung der Bakterizidie von Silberwasser (500 γ/l) durch wiederholte Keimeinsaat.

Erste Einsaat	Keimzahl nach 24 h	Nach Zentrifugieren zweite Einsaat	Keimzahl nach 2×24 h	Nach Zentrifugieren dritte Einsaat	Keimzahl nach 3×24 h	Nach Zentrifugieren vierte Einsaat	Keimzahl nach 4×24 h
50000	0	50000	0	50000	6000	50000	30000
500000	0	500000	0	500000	30000	500000	40000

Nachdem nicht nur die erste, sondern auch die zweite Keimeinsaat von dem Silberwasser bewältigt worden war, blieb von der dritten Einsaat ein Rest unabgetötet als Zeichen, daß der Silbergehalt des Versuchswassers immer mehr erschöpft wurde.

Wie Tabelle 7 zeigt, ist der bakterizide Effekt des gehärteten und des kolloidhaltigen Wassers deutlich geringer, als die Wirkung des weichen Leitungswassers. Obwohl alle 3 Wasserproben bei der chemischen Analyse den gleichen Silbergehalt von zirka 500 γ/l zeigen, tötet das Leitungswasser die Einsaat prompt in 2 Stunden ab, während die beiden anderen Proben mit störenden Stoffen diese Leistung noch nicht

in 3 Stunden vollbringen. Dabei ist die Menge der zugesetzten hemmenden Stoffe sehr gering. Analoge Ergebnisse beobachteten wir bei der Prüfung gleichartiger Wasserproben, die in Katadynflaschensterilisatoren aufbewahrt waren.

Tabelle 7. Bakterizide Wirkung von weichem Leitungswasser, gehärtetem und kolloidhaltigem Wasser mit gleichem Silbergehalt (500 γ/l).

Beschaffenheit des Wassers		Einsaat pro ml	Keimzahl pro ml in Stunden		
			1	2	3
Dresdner Leitungs-Wasser 8,6° d. H.	gesilbert	8200	90	0	0
	ungesilbert (Kontrolle)	9800	12600	12000	9600
Gehärtetes Wasser 25° d. H.	gesilbert	6500	2400	360	30
	ungesilbert (Kontrolle)	8400	6900	8900	8700
Kolloidhaltiges Wasser, 1‰ Bouillont	gesilbert	10500	960	120	30
	ungesilbert (Kontrolle)	8200	9000	9900	9300

Wie störend selbst die verhältnismäßig geringen Beimengungen des Dresdner Leitungswassers wirken, zeigt ein Vergleich des bakteriziden Effektes von Dresdner Leitungswasser und dest. Wasser. Der Unterschied tritt besonders deutlich hervor, wenn man die Bakterizidie gleichgesilberter Proben bei 0° prüft. Einen derartigen Versuch bringt Tabelle 8.

Tabelle 8. Bakterizide Wirkung von destilliertem Wasser und Leitungswasser mit gleichem Silbergehalt.

Art des Wassers	Silbergehalt des Wassers	Einsaat pro ml	Keimzahl pro ml in Stunden			
			1	4	6	24
Destilliertes Wasser	500 γ/l	13000	0	0	0	—
	100 γ/l	20000	1590	0	0	—
	10 γ/l	19000	8100	850	680	—
	ungesilberte Kontrolle	23000	16000	14500	15100	—
Dresdner Leitungs-Wasser	500 γ/l	26000	16900	2700	780	0
	100 γ/l	19000	15000	2500	1500	0
	10 γ/l	27000	18000	4600	3800	120
	ungesilberte Kontrolle	22000	26000	21000	27000	22000

Während das Leitungswasser auch bei einem Silbergehalt von 500 γ/l die Einsaat noch nicht in 6 Stunden abtötet, ist das dest. Wasser imstande, bei gleicher Silberung schon in 1 Stunde, und bei einer Silberung von 100 γ/l in 4 Stunden die zugesetzten Keime zu vernichten.

3. Verhalten gesilberten Wassers beim Gefrieren.

Die Inkongruenz zwischen chemisch bestimmbarem Silbergehalt und biologisch wirksamem Bakterizidie-Effekt — als Ausdruck der Hemmungswirkung störender Stoffe — tritt besonders deutlich hervor, wenn man das Schicksal des Silbers beim Gefrieren gesilberten Wassers verfolgt.

Tabelle 9. Silbergehalt des Schmelzwassers verschiedener Zonen eines Kristalleisriegels aus gesilbertem Leitungswasser (zirka 300 γ/l).

Lage der Probe im Eisriegel	Ag-Gehalt γ/l
Querscheibe oben	150
Schale oben	20
Kern oben	420
Querscheibe mitte	15
Schale mitte	zirka 5
Kern mitte	20
Querscheibe unten	zirka 5
Schale unten	zirka 5
Kern unten	15

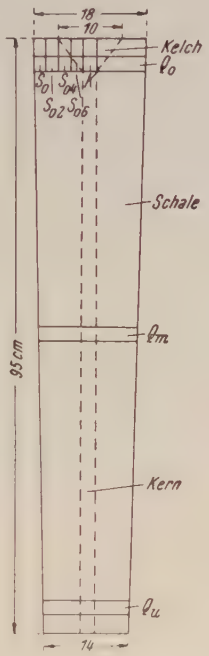


Abb. 2. Längsschnitt durch einen Kristalleisriegel ($^1/_{12}$ der nat. Größe).

Will man die Vorgänge beim Gefrieren verstehen, so ist es am zweckmäßigsten, sich zunächst einige grundsätzliche Überlegungen und einige technische Einzelheiten zu vergegenwärtigen. Bekanntlich friert aus einer Lösung zunächst das reine Lösungsmittel (H_2O) aus; infolgedessen erfährt der noch flüssige Rückstand eine Anreicherung an gelösten Stoffen, und zwar so lange, bis die Löslichkeitsgrenze des Gelösten überschritten ist.

Daß die Vorgänge beim Gefrieren tatsächlich in der dargestellten Weise ablaufen, erkennt man an der ungleichmäßigen chemischen Zusammensetzung der einzelnen Schichten und Zonen eines Eisriegels. Um systematisch vorzugehen, haben wir von drei verschiedenen Höhen der Eisriegel Proben entnommen, eine Querscheibe oben nahe der Spitze (Q_0), eine Querscheibe von der Mitte des Riegels (Q_m) und eine Querscheibe unten nahe der Basis (Q_u). Außerdem wurde eine obere Querscheibe zerlegt in mehrere Teilstücke, deren erstes die äußerste Schalenschicht repräsentierte (S_0), in je 2 cm Abstand vom Rand folgten die Stücke S_{02}, S_{04}, S_{06}, sowie schließlich ein Stück Kern (K). Die sorgfältig entnommenen Eisproben wurden zum Schmelzen gebracht; das erhaltene „Schmelzwasser" wurde in verschiedener Weise untersucht.

Wie verhält sich gesilbertes Wasser beim Gefrierprozeß? Es war zu erwarten, daß auch der Silbergehalt in analoger Weise eine Verschiebung innerhalb der einzelnen Schichten des Eisriegels erfährt. Durch mehr als 100 Einzelanalysen konnte festgestellt werden, daß in der Tat eine erhebliche Verschiebung des Silbergehaltes stattfindet. Grundsätzlich, wie bei den Salzen normalen ungesilberten Wassers, ist auch beim Silbergehalt eine Verschiebung sowohl in der Richtung von außen nach innen, als auch von unten nach oben (vgl. Tabelle 9) nachzuweisen.

Es war nun sehr interessant, die bakterizide Wirkung von Schmelzwasserproben, die aus verschiedenen Zonen von Eisriegeln stammten, mit dem chemisch ermittelten Silbergehalt zu vergleichen. Die Bakterizidie wurde gegen Bact. coli bei 0° geprüft. Einige Resultate sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Tabelle 10. Bakterizide Wirkung des Schmelzwassers verschiedener Zonen von Eisriegeln aus gesilbertem Leitungswasser.

Silbergehalt γ/l	Verdampfungs-Rückstand mg/l	Einsaat pro ml	Keimzahl pro ml nach Stunden					
			1	2	4	6	8	24
50	152	6900	3800	750	250	240	30	0
80	428	6800	960	330	60	0	0	0
150	512	11000	690	30	0	0	0	0
300	228	6600	150	120	0	0	0	0
420	5516	12000	7000	2100	330	240	30	0

Vergleicht man in Tabelle 10 die Zeitdauer, in der die Einsaat abgetötet wird, mit der Höhe des Silbergehaltes, so sieht man, daß in einer Reihe von Versuchen mit zunehmendem Silbergehalt der bakterizide Effekt steigt. Aber in manchen Versuchen bleibt die Steigerung gering, oder es tritt trotz Erhöhung des Silbergehaltes eine Verlangsamung der Bakterizidie ein. Besonders auffällig in Tabelle 10 ist das

Verhalten der ersten und der letzten Probe: bei beiden Versuchen ist die Bakterizidie gleich stark, während der Silbergehalt der letzteren Probe viermal so hoch ist, wie in der ersten Probe; die silberreiche Probe ist aber auch sehr reich an Salzen; die Verhältnisse werden ohne weiteres verständlich, wenn berichtet wird, daß die silberarme Probe aus der „Schale" eines Eisriegels stammte, die silber- und salzreiche Probe dagegen aus dem „Kern". Die Hemmung der Bakterizidie beruht darauf, daß die Salze, die beim Ausfrieren sich anreichern, Silberionen binden bzw. adsorbieren, so daß die Menge des ionisierten Silbers geringer wird, als die Menge des mit der *Haber*schen Methode nachweisbaren Silbergehaltes.

Die Versuche über das Verhalten gesilberten Wassers beim Gefrieren beleuchten eine der mannigfachen Möglichkeiten, die man kennen und berücksichtigen muß, um zu verhüten, daß die an sich prompte Silberwirkung unter gewissen Bedingungen der Praxis beeinträchtigt wird.

Nachwort.

Besonderen Dank schulden die Verfasser Herrn Prof. Dr. *Paul Hofmann* für wertvolle Mithilfe bei der Durchführung der bakteriologischen Untersuchungen.

Herr Prof. Dr. *Karl Süpfle*, auf dessen Anregung die vorliegende Arbeit im Hygienischen Institut der Technischen Hochschule Dresden entstand, ist im zweiten Weltkrieg gefallen. Seiner möge an dieser Stelle in Dankbarkeit gedacht sein.

Zusammenfassung.

Die geringen Silbergehalte oligodynamisch behandelter Lebensmittel (Katadynverfahren) werden für gewöhnlich kolorimetrisch nach *Feigl* mit p-Dimethylaminobenzylidenrhodanin oder auf potentiometrischem Wege ermittelt.

Im Gegensatz hierzu wird über Silberbestimmungen auf *trockenem* Wege (Mikrodokimastik) berichtet.

Der Vorteil dieser von *F. Haber* und Mitarbeitern in den Jahren 1925 bis 1928 entwickelten Methodik liegt in ihrer Spezifität und in der Vermeidung von Aufschlußarbeit. Das vorhandene Silber wird mit Bleisulfid niedergeschlagen, zentrifugiert, kupelliert und der zur Kugel geschmolzene Regulus mikroskopisch ausgemessen; die gesuchte Silbermenge ergibt sich rechnerisch aus Durchmesser und Dichte. Die Nachweisgrenze liegt bei 1 γ Silber. Silberverluste entstehen durch Flüchtigkeit bzw. Schlackenlöslichkeit.

Destilliertes Wasser, Leitungswasser mit und ohne Härtebildner bzw. mit und ohne organische Substanz, wurden nach dem *Krause*schen Katadynverfahren (Standprinzip) mit Silber beladen und nach *Haber*

geprüft. Parallel dazu liefen in abgestuften Zeiträumen Entkeimungsversuche, bei denen als Testkeim Bact. coli bzw. Bac. mesentericus verwendet wurde. Eindrucksvolle Ergebnisse lieferte die chemische und bakteriologische Prüfung von *Elektro-Katadyn-Eis*. Silberverteilung, Salzgehalt und bakterizider Effekt innerhalb verschiedener Zonen eines Katadyneisriegels vermittelten Einblicke in den oligodynamischen Wirkungsmechanismus.

Summary.

The slight silver contents of foods that have been subjected to oligodynamic treatment (catadyn process) is usually measured colorimetrically, after *Feigl*, by means of p-dimethylaminobenzylidene rhodanine, or potentiometrically.

In contrast, a report is given here of silver determinations by the dry method (micro-docimasy).

The advantage of this type of procedure, which was developed by *F. Haber* and his associates in 1925—28, lies in its specificity and the avoidance of the desintegration process. The silver is coprecipitated with lead sulfide, centrifuged, cupelled; the regulus melted to a bead is then measured microscopically. The silver content can be calculated from the diameter and density. The limit of detection is 1 γ silver. Losses of silver are due to volatility or to solubility in the slag.

Distilled water, tap-water with and without hardness-formers, or with and without organic matter were charged with silver by the *Krause* catadyn process and treated by the *Haber* method. The germination trials were run in parallel at graded intervals; in there *Bact. coli* or *Bact. mesentericus* were used as test organisms. Impressive results were delivered by the chemical and bacteriological testing of electro-catadyn-ice. Distribution of the silver, salt content and bactericidal effect within various zones of a catadyn ice bar yielded insights into the oligodynamic action mechanism.

Résumé.

Les faibles teneurs en argent des aliments traités oligodynamiquement (procédé catadyne) furent dosées colorimétriquement d'après *Feigl*, avec la p-diméthylaminobenzylidène rhodanine ou par voie potentiométrique. On publie par contraste des dosages d'argent par voie sèche (microdocimasie).

L'avantage de cette méthode développée par *F. Haber* et collaborateurs pendant les années 1925—28 réside dans sa spécificité et l'on évite le travail de mise en solution. L'argent présent est précipité par le sulfure de plomb, centrifugé, coupellé et l'on mesure au microscope le bouton fondu; la quantité d'argent fondu peut se déduire du diamètre et de la densité; la limite de sensibilité est au voisinage de 1 γ d'argent. Les pertes se produisent par volatilisation ou bien par dissolution dans les scories.

L'eau distillée, l'eau du robinet, dure ou non, ou encore avec ou sans substance organique, furent additionnées d'argent d'après le procédé catadyne de *Krause* et essayées d'après la méthode d'*Haber*. En même temps, on a fait des expériences de désinfection échelonnées en utilisant comme tests le *B. Coli* et le *B. mesentericus*. Des évènements sensationnels conduisirent à la preuve chimique et bactériologique de la glace électrocatadyne. La dissémination de l'argent, la teneur en sel et l'effet bactéricide dans des zones différentes d'une tablette de glace catadyne permirent de jeter un coup d'œil sur le mécanisme de l'action oligodynamique.

Literatur.

[1] *C. v. Nägeli*, Neue Denkschriften d. allgem. Schweiz. Ges. f. d. ges. Naturwiss. **33**, Abt. 1, 1893.
[2] *H. Kraemer*, Amer. J. Pharmacy **78**, 140 (1906).
[3] *P. Saxl*, Wr. klin. Wschr. **30**, 965 (1917).
[4] *G. A. Krause*, Neue Wege zur Wassersterilisierung (Katadyn). J. F. Bergmann, München 1928.
[5] *G. A. Krause*, Gesundheitsingenieur **52**, 500 (1929).
[6] *R. Degkwitz*, Klin. Wschr. **8**, 342 (1929).
[7] *F. Konrich*, Gesundheitsingenieur **52**, 804 (1929).
[8] *F. Konrich*, Arb. a. d. Reichsgesundheitsamt **62**, 223 (1931).
[9] *W. Olszewski*, Vom Wasser, III., S. 91.
[10] *H. Gottschalk*, Zbl. Bakteriol. I, **123**, 468 (1932).
[11] *K. Süpfle*, Münch. med. Wschr. **67**, 1166 (1920).
[12] *K. Süpfle*, Münch. tierärztl. Wschr. **71**, 289 (1920).
[13] *K. Süpfle*, Zbl. ges. Hyg. **1**, 129 (1922).
[14] *K. Süpfle*, Klin. Wschr. **8**, 1899 (1929).
[15] *A. Streck*, Hyg. Rundsch. **1919**, 685, 717.
[16] *H. Rosenkranz*, Arch. Hyg. **89**, Heft 6 (1920).
[17] *P. Hofmann*, Zbl. Bakteriol. I, **114**, 216 (1929).
[18] *R. Werner*, Versuche zur Frage der Wasserentkeimung durch oligodynamische Silberwirkung, Dissertation Techn. Hochsch. Dresden 1933.
[19] *C. Egg*, Schweiz. med. Wschr. **59**, 84 (1929).
[20] *O. Noetzel*, Z. Unters. Lebensmittel **78**, 315 (1939). — *A. Jendrassik* und *S. Papp*, Z. Unters. Lebensmittel **69**, 369 (1935).
[21] *F. Haber* und *J. Jänicke*, Z. anorgan. Chem. **147**, 156 (1925).
[22] *Berndt*, Über die mikrodokimastische Bestimmung von Gold und Silber. Dissertation Berlin 1927.
[23] *J. Rabinowitsch*, Dissertation Berlin 1928.
[24] *R. Plattner*, Probierkunst mit dem Lötrohre. 6. Aufl. bearbeitet von *F. Kolbeck*, Leipzig 1897.
[25] *Neißer* und *Eichbaum*, Die oligodynamische Metallwirkung in Theorie und Praxis. Weichardts Ergebnisse **13**, (1932).

Mikrochemie in der praktischen Pharmazie.

Von

F. Lüdy-Tenger, Burgdorf.

Mit 23 Abbildungen.

(Eingelangt am 15. Mai 1950.)

Eine der wichtigsten Obliegenheiten des praktizierenden Apothekers ist die Verpflichtung, Arzneistoffe und Drogen zu prüfen. Die mikrochemische Arbeitsweise sollte in vermehrtem Maße Eingang finden ins pharmazeutische Laboratorium und in die Arzneibücher, weil sie in idealer Weise allen Anforderungen gerecht wird, die man an Zuverlässigkeit, Einfachheit und Sparsamkeit stellen kann. Überdies bringt sie eine wesentliche Vermehrung analytisch verwertbarer Kennzeichen (kristalloptische Messungen).

Für den Apotheker kommt vor allem die *Identifizierung* von Substanzen in Frage. Wir legen hiermit einen *Vorschlag** vor, wie wir uns eine *amtliche Ergänzungspublikation* zum Kapitel „Allgemeine Reaktionen zur Feststellung der Identität" des schweiz. Arzneibuches, der Ph. H. V. etwa denken, um damit die mikrochemische Prüfung als gleichberechtigt anzuerkennen. Wir haben aus der sehr großen Zahl bekannter Reaktionen eine *Auswahl* getroffen, denn in der pharmazeutischen Mikropraxis können nur ganz eindeutige, charakteristische und gut reproduzierbare Identitätsreaktionen in Frage kommen.

Als wichtigste *Reinheitsprüfungen* kommen natürlich auch für das Apothekenlaboratorium besonders Schmelzpunkts- und Siedepunktsbestimmungen in Frage.

Mikrobestimmung des Schmelzpunktes (F).

Man wird sich in erster Linie des bekannten *Kofler*-Apparates bedienen und überhaupt die geistvollen Methoden von *L.* und *A. Kofler*[1] heranziehen. Als wir während des Krieges völlig auf uns selber angewiesen waren, hat ein Mechaniker am Technikum Burgdorf zu eigenem Hausgebrauch der Chemieschüler ebenfalls eine elektrisch heizbare Mikro-

* Der Verfasser brachte während seines Vortrages einen vervielfältigten diesbezüglichen Vorschlag im Auditorium zur Verteilung.

skopierheizplatte geschaffen, die sich auch für das Laboratorium der Apotheke als recht zweckmäßig erwies, nachdem sie zum eigentlichen *Mehr-*

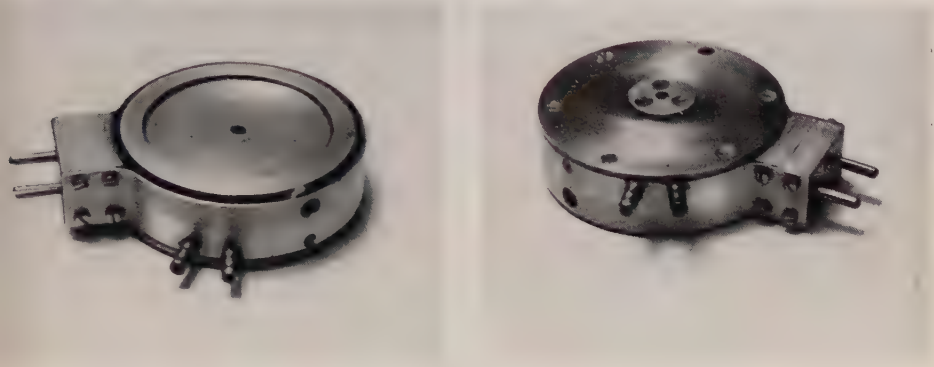


Abb. 1. „T. B.-Block" von oben und von unten gesehen.

Abb. 2. Mikrobestimmung des Schmelzpunktes mit dem „T. B.-Block".

*zweck*apparat ausgestaltet worden war (Abb. 1). Dem Technikum Burgdorf zu Ehren nannten wir den Apparat „T. B.-Block"[2]. Zur Mikrobestimmung des F verfährt man auch hier nach den Angaben von *Kofler* (Abb. 2).

Die Ph. H. V. läßt den „unkorrigierten F" bestimmen. Da sich aber in der Literatur häufig „korrigierte F" vorfinden, war es wünschenswert,

zwischen beiden Größen Beziehungen herzustellen. Dies gelang, indem wir ohnehin für das Stabthermometer des „T. B.-Blockes" irgendeine Eichung vornehmen mußten. Wir bestimmten von einer ganzen Reihe Substanzen die Schmelzpunkte

a) auf dem „T. B.-Block",

b) in einem Schwefelsäure-Glaskapillare-Apparat nach Ph. H. V.,

c) in einem analogen Kapillareapparat, wobei die Thermometerquecksilbersäule ständig von Heizschwefelsäure umspült blieb.

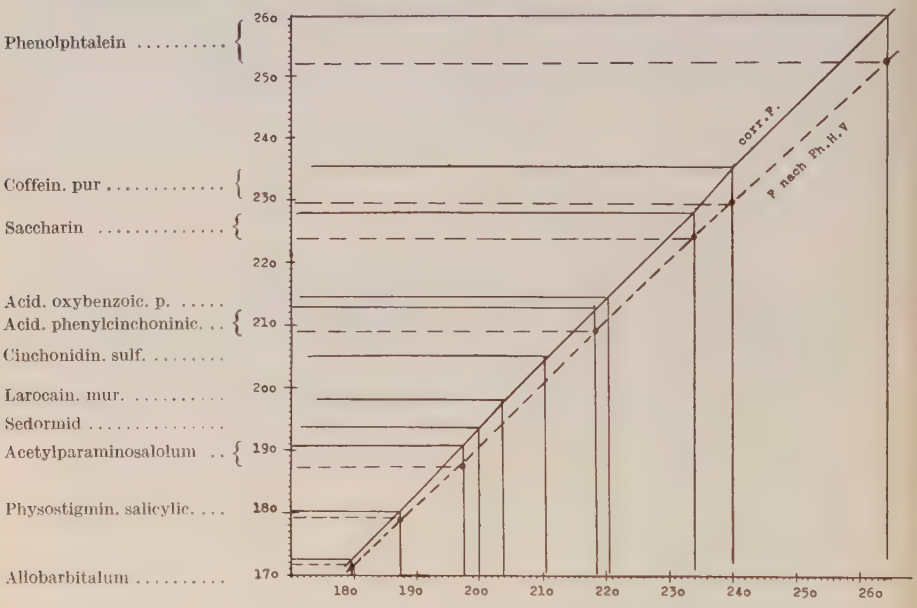


Abb. 3. Teil einer Eichkurve (korr. und unkorr. F).

Die gewonnenen Werte verarbeiteten wir zu *Eichkurven* (Abb. 3), so daß wir nun zu jeder am „T. B.-Block" abgelesenen Temperatur den zugehörigen korrigierten *oder* den unkorrigierten F ablesen können. Besonders wertvoll ist für uns die Tatsache, daß man auch *Tablettenmassen* prüfen kann. Hervorgehoben sei auch, daß man sehr gut *Molekulargewichtsbestimmungen nach Rast*[3] durchführen kann, wie wir schon 1947 zeigten (Abb. 4). Das Substanz-Kampfer-Gemisch wird in einer *beidseitig* zugeschmolzenen Kapillare in einem auf den „T. B.-Block" passenden gelochten Metallzapfen untersucht.

Mikrobestimmung des Siedepunktes.

Zur Siedepunktsbestimmung minimaler Flüssigkeitsmengen bedient man sich der von *Emich*[4] angegebenen Methode (Kontrolle im Mikroskop,

ob sich das notwendige Luftbläschen beim Zuschmelzen der Kapillare wirklich auch gebildet hat!). Zur Befestigung der Kapillare am Thermometer verwenden wir eine aus Platindraht gewundene Doppelspirale, die sich mit der gröberen Wicklung am Thermometer festhält und mit der feineren Wicklung federnd die Kapillare trägt.

Mikrosublimation.

Zur *Untersuchung von Drogenpulvern* bedient sich der Pharmazeut oft mit Erfolg der *Mikrosublimation*, allerdings nicht mehr der etwas

Abb. 4. „T. B.-Block", eingerichtet zur Molekulargewichtsbestimmung nach *Rast*.

zu primitiven Methode nach *Tunmann*[5], wohl aber einer aus halbierten Objektträgern und Glasringen zusammengestellten *Mikrogaskammer* nach *Molisch*, die sich trefflich mit dem „T. B.-Block" kombinieren läßt (Abb. 5). Der Vorgang der Sublimation, besonders auch die Hofbildung, lassen sich gut verfolgen und die optimalen Temperaturbereiche festlegen. Die resultierenden Sublimate kann man mikrochemisch oder durch Mikro-F-Bestimmungen prüfen.

Oft noch bessere Resultate erzielt der Apotheker, wenn er die Drogenpulver der *Mikrosublimation im luftverdünnten Raum* unterwirft. Der von *Eder*[6] angegebene, kleine Glasapparat läßt sich ebenfalls mit dem „T. B.-Block" zweckmäßig kombinieren (Abb. 9), wobei man die am Widerstand eingestellte Temperatur stundenlang konstant halten kann. Das nötige Vakuum, etwa 25 mm Hg, erhält man leicht mit einer Wasserstrahlpumpe.

Folgende Beispiele zeigen den Unterschied der Sublimate mit oder ohne Vakuum:

a) Hydrochinon aus Fol. Uvae Ursi Blocktemperatur 160°, ohne Vakuum (Abb. 10), mit Vakuum (Abb. 11).

b) Sublimat aus Lichen islandicus. Blocktemperatur 190 bis 200°, ohne Vakuum (Abb. 12), mit Vakuum (Abb. 13).

Abb. 5. „T. B.-Block" mit Mikrogaskammer nach *Molisch*, zur Mikrosublimation eingerichtet.

Optische Beobachtungen.

Der „T. B.-Block" wird am Mikroskop nicht festgeschraubt, er liegt flach auf dem Mikroskoptisch auf und hält sich nur mit einer runden Metallscheibe, die an der Unterseite angebracht ist, fest. Wohl wird dadurch eine Wasserkühlung notwendig. Dem steht aber der Vorteil gegenüber, daß der „T. B.-Block" (ohne Strom- und Wasserzuleitungen) für sich allein als *drehbarer Mikroskoptisch* (Abb. 14) verwendet werden kann, nachdem man einen Transporteur aus Celluloid untergelegt hat.

Mit dieser einfachen Apparatur kann man *Winkel an Kristallen messen* und nach Anbringen der Polarisationsoptik die „*Auslöschrichtungen*" an Kristallen bestimmen. Um die Polarisationsoptik jeweils rasch und

Abb. 6. Sublimat aus Sedormid-Tabletten.

Abb. 7. Sublimat aus Sterosan-Puder.

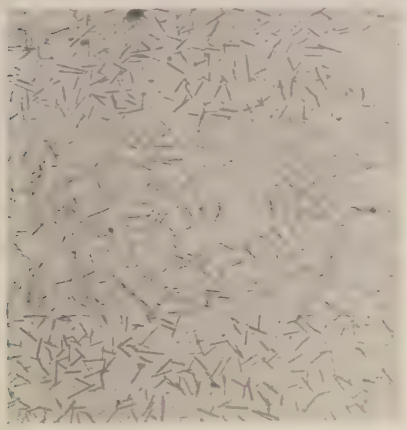


Abb. 8. Sublimat: Coffein aus Extr. Colae fluidum.

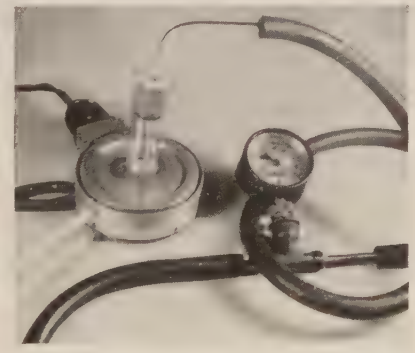


Abb. 9. Vakuum-Sublimierapparat *Eder* mit „T. B.-Block" kombiniert.

sicher auf „gerade Auslöschung" einstellen zu können, haben wir uns *Dauerpräparate* hergestellt (Abb. 15):

Ein Tröpfchen heiße, wäßrige *Oxalsäure*lösung 1 : 4 auf einem halbierten Objektträger völlig eintrocknen lassen. Zugabe von Kanadabalsam in Benzol.

Als Beispiel „schiefer Auslöschung“ sei Salicylsäure erwähnt (Abb. 16). Als Mittelwert von 10 Messungen erhielten auch wir die in der Literatur angegebene schiefe Auslöschung von 43°.

Abb. 10. Hydrochinon aus Fol. Uvae Ursi bei 160° Blocktemperatur ohne Vakuum sublimiert.

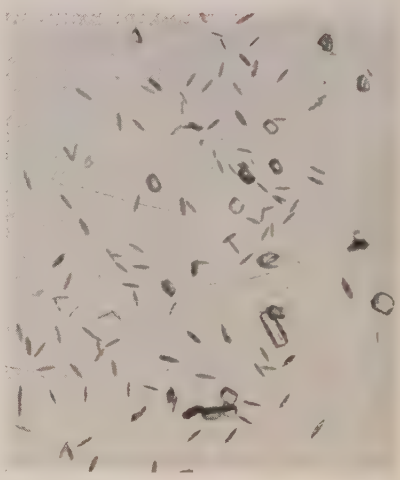


Abb. 11. Hydrochinon aus Fol. Uvae Ursi bei 160° Blocktemperatur mit Vakuum sublimiert.

Abb. 12. Sublimat aus Lichen islandic. bei 200° Blocktemperatur ohne Vakuum gewonnen.

Abb. 13. Sublimat aus Lichen islandic. bei 200° Blocktemperatur mit Vakuum gewonnen. (Beide Aufnahmen bei gleicher Vergrößerung gemacht!)

Der Apotheker kann sich eine ganze Reihe *behelfsmäßig zusammengestellte mikrochemische Geräte* schaffen und so die Legende von den so teuren Apparaten entkräften. Wir erwähnen hier nur Mikrobrenner,

Mikroperkolator und Mikroschüttelapparat, die ausschließlich aus Glasampullen, Korkzapfen u. dgl. zusammengestellt wurden. Mit solch

Abb. 14. „T. B.-Block" als „drehbarer" Mikroskoptisch.

Abb. 15. Dauerpräparat Acid. oxalic. 1 : 4 zum Einstellen der „geraden Auslöschung". (Die Auslöschrichtungen verlaufen hier parallel zu den Bildrändern.)

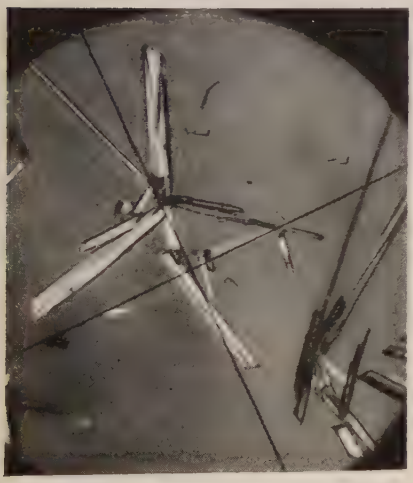


Abb. 16. Beispiel „schiefer Auslöschung": Acid. salicylicum mit 43°.

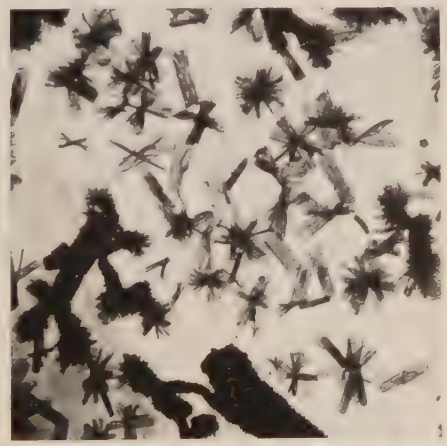


Abb. 17. Coffein mit „Bi-J".

einfachsten Hilfsmitteln können im Apothekerlaboratorium mikrochemisch wesentliche *Vorarbeiten* für *pflanzenchemische Untersuchungen* und auch für *galenische Präparate* durchgeführt werden. So resultieren in viel

kürzerer Zeit und mit minimalen Substanzmengen Ergebnisse, die nachher ohne Mühe im großen durchgeführt werden können. Gegenwärtig sind

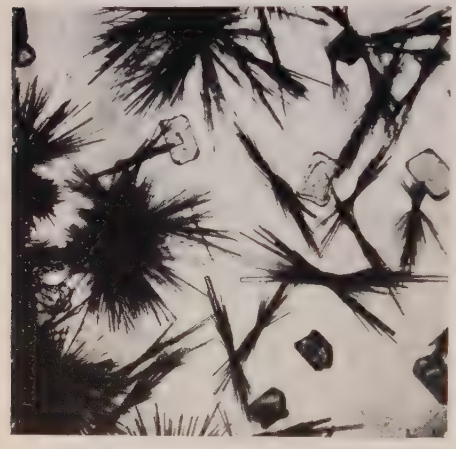


Abb. 18. Theobromin mit „Bi-J".

Abb. 19. Dial mit „Fe-ClJ".

wir damit beschäftigt, auf mikrochemischem Wege Darstellungsmethoden zu finden für galenische Präparate aus selbstangebauter

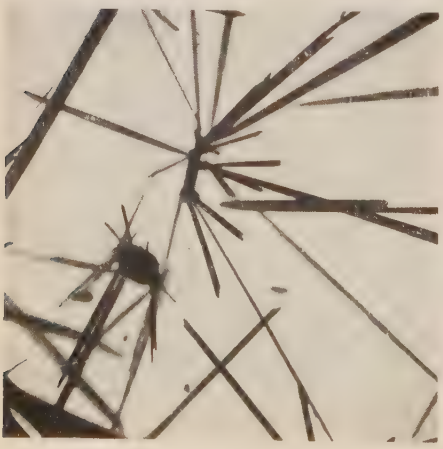


Abb. 20. Veronal mit „Fe-ClJ".

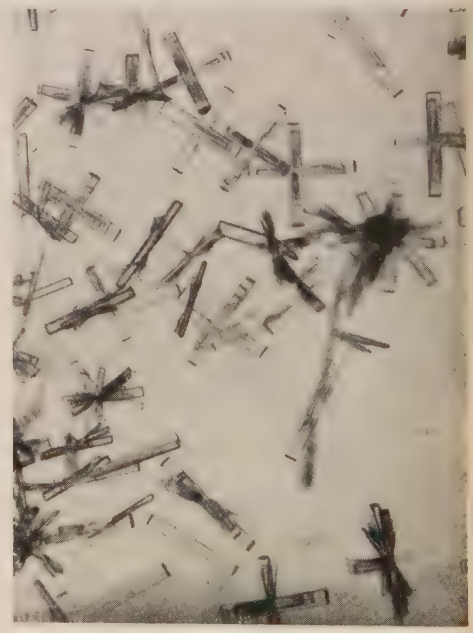


Abb. 21. Urotropin mit Kupferacetat.

Digitalis lanata, wobei ausschließlich ausgeschüttelt und zentrifugiert wird unter Vermeidung irgendwelcher Filter.

Zum Schlusse sei uns gestattet, an einige von uns schon früher veröffentlichte *Identitätsreaktionen* zu erinnern, da sie besonders im Apothekerlaboratorium nützliche Dienste leisten können:

1. Unterscheidung von *Coffein*, *Theobromin* (und Theophyllin) (Abb. 17 und 18) mit unserem Reagens „Bi-J“[7], einer komplexen Lösung aus

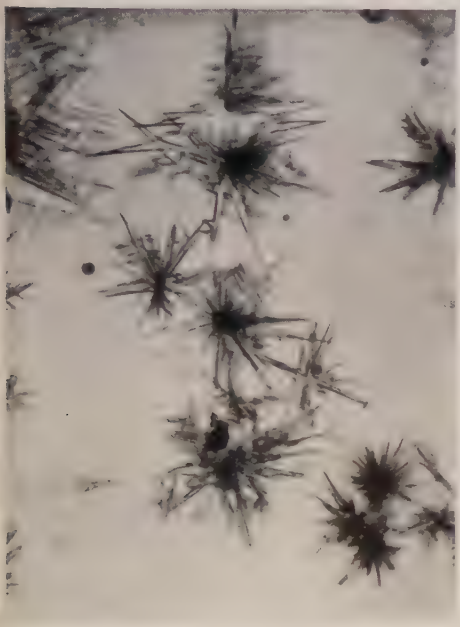


Abb. 22. Helmitol mit Benzolsulfosäure 10%.

Abb. 23. Berberin mit Benzolsulfosäure 10%.

Rp. Bismuti subcarbonici 0,5
Acidi hydrochlor. conc. ... 1,0
Kalii iodati 3,0
Aquae dest. ad ..... ccm 10,0

2. Unterscheidung von *Dial* und *Veronal* (Abb. 19 und 20) mit unserem Reagens „Fe-ClJ“[8], einer komplexen Lösung aus

Rp. Ferri sesquichlorati sol. ... 3,0
Acidi hydrochlor. conc. ... 1,0
Kalii iodati 3,0
Aquae dest. ad ..... ccm 10,0

3. Nachweis von *Urotropin* mit Kupferacetat[9] (Abb. 21).
4. Nachweis von *Helmitol* mit Benzolsulfosäure, 10%[10] (Abb. 22).
5. Nachweis von *Berberin* mit Benzolsulfosäure, 10%[11] (Abb. 23).
6. Nachweis von *Nicotylamid* mit „Bi-J“-Reagens[12].

Die entstehenden, leuchtend roten Blättchen löschen gerade. Diese Reaktion haben wir noch nicht veröffentlicht.

Mögen diese wenigen Hinweise dazu beitragen, daß die so mannigfach verwendbaren mikrochemischen Arbeitsmethoden in den Apothekenlaboratorien in vermehrtem Maße zur Verwendung gelangen, wie das namhafte Autoren, unter ihnen namentlich auch unser hochverehrter Lehrer und Freund, Prof. *Rosenthaler*, Istanbul, seit Jahren befürworten.

Zusammenfassung.

Auch im Apothekenlaboratorium können als wichtigste *Reinheits*prüfungen Schmelzpunkts- und Siedepunktsbestimmungen nach mikrochemischen Methoden durchgeführt werden. Selbst Spuren von Tablettenmassen können so geprüft werden. Wir zeigten schon 1947, daß *Molekulargewichtsbestimmungen* nach *Rast* auf dem „T. B.-Block" mit beidseitig zugeschmolzenen Kapillaren möglich sind. „T. B.-Block", kombiniert mit Mikrogaskammer nach *Molisch*, ermöglicht rationelles (und reproduzierbares) *Mikrosublimieren* von Drogenpulvern, kombiniert mit *Eders* Apparatchen sehr schöne *Vakuum-Mikrosublimate*. Der „T. B.-Block" selber kann dienen als „drehbarer Mikroskopiertisch". Diese Vorrichtung ermöglicht *Messen von Kristallwinkeln* und *Bestimmen der „Auslöschrichtungen"*.

Neben analytischen Arbeiten ermöglicht die Mikrochemie aber auch, daß im pharmazeutischen Laboratorium mit minimalen Substanzmengen und in sehr kurzer Zeit *Voruntersuchungen* durchgeführt werden, sei es, um *pflanzenchemischen Untersuchungen* oder der *Darstellung galenischer Präparate* den Weg zu ebnen.

An selbstbeobachteten Identitätsreaktionen dürften als für die pharmazeutische Praxis besonders gut verwendbar erwähnt werden: Unterscheidung von Coffein, Theobromin (und Theophyllin), Unterscheidung von Allobarbitalum, Barbitalum und Phenobarbitalum, ferner Identifizierung von Urotropin, Helmitol, Berberin und Nicotylamid.

Summary.

Melting point- and boiling point determinations by microchemical methods can be made also in the apothecary laboratory as important *tests of purity*. Even traces of tablet masses can be tested in this way. As early as 1947, the author showed that *molecular weight determinations* after *Rast* on the "T. B.-Block" with capillaries closed at both ends, are possible. The "T. B. Block" combined with the micro gas chamber after *Molisch* permits a rational (and reproducible) *micro-sublimation* of drug powders, combined with *Eder*'s little apparatus a very nice *vacuum microsublimate* is possible. The "T. B.-Block" itself can serve as a rotatable microscope table. This arrangement permits measurement of *crystal angles* and determination of *extinction directions*.

In addition to analytical studies, microchemistry also makes it possible to carry out *preliminary investigations* in the pharmaceutical laboratory with very small quantities and in a very short time, to facilitate *plant chemical studies* or the *production of galenical preparations*.

The following identification reactions are recommended, from the authors own experience, as especially suited to pharmaceutical practice: differentiation of coffein, theobromine and theophylline; differentiation of allobarbitalum, barbitalum and phenobarbitalum; identification of urotropine, helmitol, berberine and nicotylamide.

Résumé.

Dans les officines de pharmaciens, les déterminations de point de fusion et d'ébullition d'après les procédés microchimiques peuvent être utilisées comme critère de *pureté* très important. Nous avons déjà montré en 1947 que la détermination du *poids moléculaire* suivant *Rast* au «T. B. Block» est possible, au moyen des capillaires soudés des deux côtés. Le «T. B. Block» combiné avec la microchambre à gaz d'après *Molisch*, permet des *microsublimations* rationnelles (et reproductibles) de drogues en poudre et combiné avec le petit appareil d'*Eder*, permet de beaux *microsublimats dans le vide*. Le «T. B. Block» lui-même peut servir de platine tournante. Ce dispositif permet de faire les mesures d'*angles de cristaux* et la détermination des *directions d'extinction*. A côté des travaux analytiques, la microchimie permet aussi, du fait que dans les laboratoires pharmaceutiques sont exécutés des *essais préliminaires* en un temps très court avec des quantités minimes de substance, d'aplanir le terrain pour les *investigations phytochimiques* ou pour la *préparation galénique*.

Comme réactions d'identité, on doit mentionner particulièrement pour la pratique pharmaceutique: la distinction de la caféine, de la théobromine et de la théophylline, la distinction de l'allobarbital, du barbital et du phénobarbital, puis, l'identification de l'urotropine, de l'helmitol, de la berbérine et du nicotylamide.

Diskussion.

Fr. *M. Brandstätter* (Innsbruck, Österreich): Inwiefern ist der Apparat des Vortragenden ein „Mehrzweckapparat" gegenüber dem *Kofler*schen Apparat?

H. *F. Lüdy-Tenger*: Der Apparat soll keine Konkurrenz sein, sondern wir wollten nur zeigen, daß man sich in der Schweiz zur Zeit, als es nicht möglich war, *Kofler*sche Apparate zu bekommen, selbst geholfen hat und ein sehr brauchbares Gerät baute.

Literatur.

[1] *L. Kofler*, Mikroskopische Methoden zur Identifizierung organischer Substanzen, 1940 (Beih. z. d. Z. d. Ver. dtsch. Chemiker), Verlag Chemie G. m. b. H. Berlin W 35. — *A. Kofler*, Mikro-Methoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische, Innsbruck, 1947, 2 mimiogr. Bde.

[2] *F. Lüdy*, Der „T. B.-Block" und einige seiner Anwendungsmöglichkeiten, Pharmac. Acta Helvetiae **22**, 460—488 (1947).

[3] *K. Rast*, Ber. dtsch. chem. Ges. **55**, 1051, 3727 (1922).

[4] *F. Emich*, Mikrochemisches Praktikum, 1924, S. 35.

[5] *P. O. Tunmann*, vgl. *L. Rosenthaler*, Qualitative pharmazeutische Analyse, Stuttgart, 1922, S. 2.

[6] *R. Eder*, Über Mikrosublimation von Alkaloiden im luftverdünnten Raum, Dissertation Eidg. Techn. Hochschule Zürich, 1912, S. 21, Abb. 2.

[7] *F. Lüdy*, Einige neue mikrochemische Identitätsreaktionen für die pharmazeutische Praxis, Pharmac. Acta Helvetiae **19**, 385 (1944).

[8] *F. Lüdy*, ebenda.

[9] *F. Lüdy*, Mikrochemische Mitteilungen aus der Praxis, Pharmac. Acta Helvetiae **24**, 16—19 (1949).

[10, 11] *F. Lüdy*, ebenda.

[12] *F. Lüdy*, unveröffentlicht.

Aus dem Forschungslaboratorium der Biochemie G. m. b. H., Kundl.

Eine Mikromethode zur hämolytischen Tyrothricinbestimmung.

Von

Wilhelm Friedrich.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

Das im Jahre 1939 von *Dubos* erstmalig dargestellte Tyrothricin gehört zu den wenigen Antibiotika, die in der Therapie des Menschen und auch des Tieres eine Bedeutung errangen und heute großtechnisch hergestellt werden.

Die allgemeinste Methode der Tyrothricinbestimmung ist der bakteriologische Verdünnungstest. Als Testorganismen werden *Staphylococcus aureaus*, verschiedene *Streptokokken*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. casei*, *Cl. perfringens* usw. verwendet. Diese Methode ist jedoch sehr zeitraubend und gibt — wie übrigens alle bakteriologischen Teste — sehr ungenaue Werte.

S. C. Rittenberg, *H. E. Sternberg* und *W. G. Bywater*[1] beschrieben eine kolorimetrische Methode, die das Tryptophan des Tyrothricins erfaßt. Ein Nachteil dieser Methode ist, daß sie auch die tryptophanhaltigen Begleitstoffe, die therapeutisch ohne Bedeutung sind, mitregistriert.

Zu erwähnen wäre noch die von *R. J. Dubos* und *R. D. Hotchkiss*[2] beschriebene Methode der Tyrothricinbestimmung in den Kulturfiltraten durch direkte Isolierung des bakteriziden Stoffes. Diese Methode ist jedoch wegen ihrer Umständlichkeit für Serienbestimmungen nicht geeignet.

K. P. Dimick[3] und *G. G. Villela* und *A. Cury*[4] arbeiteten eine hämolytische Tyrothricinbestimmung aus, indem sie sich auf die Beobachtung stützten, daß die Wirkungen des Tyrothricins — hämolytische und bakteriostatische — parallel gehen. Die genannten Autoren benützen eine Suspension von Rattenerythrozyten in physiologischer Kochsalzlösung. Die nach Zusatz alkoholischer Tyrothricinlösung auftretende

Hämolyse wird an der Änderung der Lichtdurchlässigkeit verfolgt, wobei als Meßgerät von *Dimick* ein photoelektrisches Kolorimeter, von *Villela* das *Pulfrich*-Photometer benützt wird. Die Ablesung erfolgt nach 2 Min., der Fehler wird von den Autoren auf zirka 5% geschätzt. Für jede verwendete Blutmenge muß eine Standardkurve festgesetzt werden. Die Autoren geben nicht an, bei welcher Temperatur sie ihre hämolytischen Arbeiten durchgeführt haben.

Ein Nachteil der erwähnten hämolytischen Methoden ist die Notwendigkeit der Benützung eines Kolorimeters bzw. Photometers und die Notwendigkeit der Unterhaltung eines Tierstalles.

Die in dieser Arbeit vorgeschlagene Methode, bei der der Hämolyseverlauf durch direkte Beobachtung der Erythrozyten verfolgt wird, erfordert nur ein gewöhnliches Mikroskop und eine Anzahl einfacher Glasgeräte, die ohne weiteres zugänglich sind. Als Blutspender dient der Untersucher selbst. Der Bedarf an Blut beträgt nicht mehr als einige Tropfen und die gewünschte Blutmenge kann jederzeit mit Hilfe eines Schneppers aus der Fingerbeere entnommen werden. Um die Arbeitsweise weiter zu vereinfachen, wurde hier von der Gewinnung reiner Erythrozyten Abstand genommen. Es wird mit 1 : 40 verd. Vollblut gearbeitet, wobei natürlich andere Hämolysewerte erhalten werden, als wenn man gewaschene Erythrozyten benützt.

Die Herstellung des verdünnten Blutes. 0,1 ml Vollblut wird sofort nach Entnahme mit 3,9 ml einer auf p_H 7,3 gepufferten sterilen Lösung, bestehend aus 1% Natriumcitrat, 2% Glukose und 0,1% Natriumchlorid in dest. Wasser, verdünnt. Diese Verdünnungsflüssigkeit bewirkt nach *Domanig*[5] die optimale Haltbarkeit der Erythrozyten. Im Eisschrank aufbewahrt, behält das so verd. Blut in bezug auf Hämolyse mehrere Tage lang die gleichen Eigenschaften.

Die Herstellung der Tyrothricinsuspension. Im Gegensatz zu *Dimick* und *Villela* wird hier nicht mit einer Tyrothricinlösung in 95%igem Alkohol, sondern mit einer wäßrigen Suspension, enthaltend zusätzlich 5,2% chemisch reiner Glukose und 5% Alkohol, gearbeitet. Zwecks Herstellung der Suspension wird zu einer alkoholischen Tyrothricinlösung das 19fache Volumen einer wäßrigen, 5,2%igen Glukoselösung zugegeben. Eine umgekehrte Reihenfolge der Zusätze gibt oft leichte Ausflockungen. Diese Tyrothricinsuspension ist schwach opaleszierend und mehrere Tage haltbar. Die Benützung von Glukose zur Haltbarmachung von wäßrigen Tyrothricinsuspensionen findet übrigens auch — neben gewissen quarternären Ammoniumsalzen — bei der Herstellung von pharmazeutischen Tyrothricinpräparaten Verwendung[6].

Durchführung der Bestimmung. Zur Erfassung des Endpunktes der Hämolyse diente ein gewöhnliches Mikroskop mit einer 225fachen Vergrößerung. An sonstigen Geräten sind notwendig: einige Kapillar-

pipetten, einige Objektträger mit Hohlschliff sowie eine größere Menge gewöhnlicher Objektträger und Glasstäbchen mit Kugelende. Die zur Bestimmung gelangende Tyrothricinsuspension in 5,2%iger Glukose soll eine Tyrothricinkonzentration von 80 bs 200 γ/ml besitzen. Die Herstellung der zur direkten Bestimmung dienenden Tyrothricin-Blutmischungen erfolgt auf einem Objektträger; es werden auf den letzteren nacheinander

0,05 ml des 1 : 40 verd. Blutes,
x ml einer wäßrigen 5,2%igen Glukoselösung mit 5% Alkohol,
0,05—x ml der zu testenden Tyrothricinsuspension,

mit Hilfe von Kapillarpipetten gebracht, wobei darauf geachtet werden soll, daß die drei Tröpfchen nicht zu weit voneinander liegen. Die drei Tröpfchen werden mit Hilfe eines Glasstäbchens mit Kugelende vereint und sorgfältig verrührt. Der Zeitpunkt der Vermischung wird notiert und ein kleines Tröpfchen, mit dem Kugelende des Glasstäbchens entnommen und auf ein Deckglas gebracht, wird als „hängender Tropfen" beobachtet. Man muß darauf achten, daß der Vaselinring den Hohlschliff des Objektträgers gut abschließt, damit keine Verdunstung stattfindet. Das auf den Objektträger gebrachte Bluttröpfchen, dessen Durchmesser 4 bis 5 mm beträgt, wird nun im Mikroskop genau zentriert und das Präparat bleibt in dieser Lage bis zur vollendeten Hämolyse. Ein zeitweises Herausnehmen, falls die Hämolyse länger dauert, ist nicht statthaft, damit die Erythrozyten ihre Lage nicht verändern. Es ist hier zu bemerken, daß die Hämolyse nicht im ganzen Präparat mit der gleichen Geschwindigkeit vor sich geht, vielmehr ist sie intensiver in der Tröpfchenmitte und träger in den Randpartien. Falls das Präparat bewegt wird, wandern die Erythrozyten in die Mitte und es wird eine zu lange Hämolysedauer notiert. Als Endpunkt der Hämolyse wird der Zeitpunkt festgelegt, in dem nur 7 (eine willkürlich angenommene Zahl) Erythrozyten im Gesichtsfeld erscheinen. Die im mikroskopierten Präparat vorhandene Tyrothricinkonzentration wird an Hand einer Eichkurve (Abb. 1) direkt abgelesen, zu deren Herstellung hier ein Tyrothricinpräparat der Pariser Firma Roger Bellon diente.

Fehlerquellen der Bestimmung.

a) *Temperaturschwankungen.* Über die Temperaturabhängigkeit der Hämolyse ist in der Tyrothricinliteratur meines Wissens nichts bekannt geworden. Wie eigene Versuche zeigten, ist die durch Tyrothricin verursachte Hämolyse temperaturabhängig (Abb. 2)*, es ist deshalb

* Die hier erhaltenen Hämolysezeiten sind kürzer als die aus der Abb. 1 zu entnehmenden, was durch die Verschiedenheit der Versuchsmethodik verursacht ist. Die Kurve (Abb. 2) gilt für eine Tyrothricinkonz. von 60 γ/ml.

unbedingt notwendig, eine genaue Temperaturkontrolle aufrechtzuerhalten; es müßte womöglich in einem Thermostatenraum gearbeitet werden. Das Arbeiten bei einer erhöhten Zimmertemperatur (z. B. bei 24°) ist vorteilhaft, weil sich dabei die Körperwärme des Untersuchers nicht allzusehr auswirkt. Hier wurde normalerweise bei 24° gearbeitet, für diese Temperatur gilt auch die Eichkurve (Abb. 1).

Zur Prüfung der Temperaturabhängigkeit der Hämolyse diente folgender Versuch. In ein Schälchen mit flachem Boden und einem Durch-

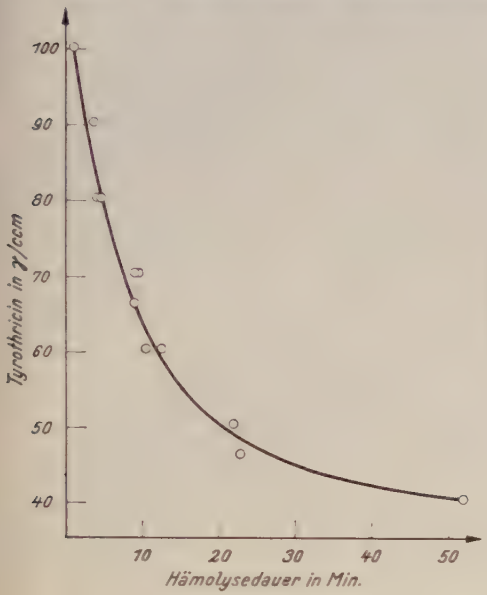


Abb. 1.

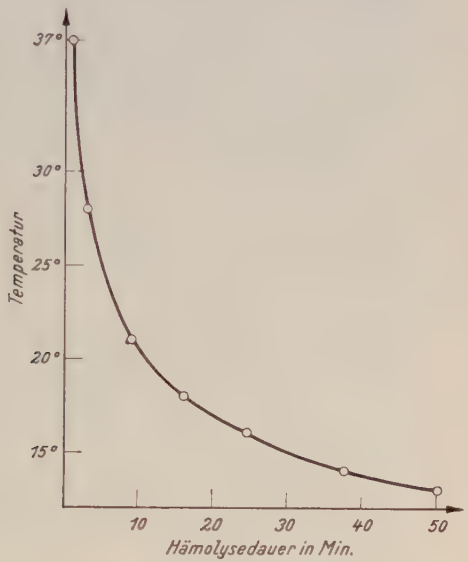


Abb. 2.

messer von 16 mm und einer Höhe von 27 mm wurden nacheinander 0.05 ml des verd. Blutes und eine entsprechende Menge der 5,2%igen Glukoselösung sowie der Tyrothricinsuspension einpipettiert, so daß das Gesamtvolumen der Füllung 0,1 ml betrug. Der Zeitpunkt der Tyrothricinzugabe wurde notiert, der Inhalt durch Umschwenken verrührt und das Schälchen sofort in ein vorbereitetes Wasserbad getaucht (dazu diente ein Drahtkörbchen). Alle 2 Min. wurde der Inhalt durch ein fünfmaliges Umschwenken des Gläschens verrührt, um das Absetzen der Erythrozyten zu verhindern. Eine frische, nicht hämolysierte Probe sieht trüb aus, gegen Ende der Hämolyse wird sie klar und durchsichtig. Ab diesem Zeitpunkt wurde in entsprechenden Zeitabständen (z. B. alle 2, 4 usw. Min.) — anschließend an das Verrühren — mit dem Glasstäbchen ein Tröpfchen entnommen, auf einen gewöhnlichen Objektträger gebracht und die Erthrozytenzahl beobachtet. Es wurde der Zeitpunkt

abgeschätzt, in dem nur 7 Erythrozyten im Gesichtsfeld sichtbar waren. Auch hier wurde das Tröpfchen genau zentriert und nur das eine Gesichtsfeld beobachtet.

b) *Ablesefehler im Mikroskop.* Die Schichtdicke des mikroskopischen Präparates ist nur grob kontrollierbar, und zwar durch den Kugeldurchmesser des Stäbchens (in diesem Falle 2,8 bis 3 mm) und durch den Durchmesser des Tröpfchens (4 bis 5 mm). Diese mangelhafte Kontrolle der Schichtdicke kann jedoch keine großen Fehler hervorrufen, wie aus der Streuung der Punkte der Eichkurve zu ersehen ist. Es empfiehlt sich auf alle Fälle, jede Bestimmung zwei- bis dreimal durchzuführen und das Mittel zu nehmen. Der Durchmesser des mikroskopischen Gesichtsfeldes betrug hier 0,675 mm. Bei Anwendung anderer Okulare bzw. Objektive muß man selbstverständlich als Endpunkt der Hämolyse nicht 7, sondern eine entsprechend korrigierte Erythrozytenzahl annehmen.

c) *Wechselnde Beschaffenheit der Erythrozyten.* Versuche mit drei Tage im Eisschrank aufbewahrten Erythrozyten ergaben das gleiche Ergebnis wie mit frischen, hier wurde jedoch stets mit 12 bis 24 Stunden altem Blut gearbeitet. Das Blut dreier verschiedener Menschen ergab keine auffallenden Differenzen. Wie *Villela* und *Cury*[7] berichten, verhalten sich jedoch die Erythrozyten verschiedener Tiere bezüglich der Hämolyse verschieden, und zwar sind die Schaf- und Taubenerythrozyten weniger tyrothricinempfindlich als diejenigen des Kaninchens, Meerschweinchens und Pferdes. Die Erythrozyten des gesunden Menschen verhalten sich in dieser Beziehung wie diejenigen empfindlicher Tiere. Es empfiehlt sich auf alle Fälle, um größere Bestimmungsfehler zu vermeiden, für jede neue Blutprobe eine neue Eichkurve (Abb. 1) herzustellen.

Wichtig ist vor allem, die Erythrozyten erschütterungsfrei aufzubewahren und sie im Aufbewahrungsgefäß im Laufe der Bestimmung nicht zu heftig und nicht zu oft umzurühren (das Umrühren vor jeder Entnahme ist unerläßlich, weil sich die Erythrozyten rasch absetzen). Es ist zweckmäßig, den für eine Reihe von Bestimmungen vorgesehenen Blutvorrat auf mehrere Gefäße (z. B. Spitzröhrchen) zu verteilen, so daß aus einem Gefäß Blut für nur drei bis vier Bestimmungen entnommen wird.

d) *Schwankungen in der Zusammensetzung des Tyrothricins und Einfluß von Begleitstoffen.* Das Tyrothricin besteht aus einem Gemisch von Tyrocidin (zirka 60%) und Gramicidin (zirka 20 bis 25%)[8]. Über sonstige Begleitstoffe, die sicherlich stets vorhanden sind[9], ist noch wenig bekanntgeworden. Es wird angenommen, daß das Mengenverhältnis der zwei bekannten Tyrothricinbestandteile konstant ist[11]. *Dimick*[3] befaßte sich mit der hämolytischen Aktivität verschiedener Mischungen

von Tyrocidin und Gramicidin und fand, daß Mischungen, enthaltend 10 bis 35% Gramicidin, praktisch gleich hämolytisch wirken. Reines Tyrocidin besaß nach *Dimick* nur zirka 80% der Tyrothricinwirkung. Diese Beobachtungen (die allerdings an gewaschenen Erythrozyten gemacht wurden) konnten in eigenen Versuchen nicht bestätigt werden. Vielmehr erwies sich, daß das aus unserem Tyrothricin gewonnene kristalline Tyrocidinhydrochlorid*, in üblicher Weise getestet, viel stärker hämolytisch ist als der Tyrothricinstandard. Wie aus der Tabelle ersichtlich, besitzen Tyrocidinhydrochlorid-Gramicidin**-Mischungen mit bis zu 20% Gramicidin noch keinen nennenswerten Einfluß auf die hämolytische Aktivität des Tyrocidinhydrochlorids, größere Mengen bewirken jedoch einen Abfall der Aktivität, was vielleicht auf die ausflockende Wirkung des Gramicidins zurückzuführen wäre (eine Suspension von Gramicidin in 5,2% Glukose ist sehr wenig haltbar und flockt fast sofort aus). Ob sich im natürlichen Tyrothricin das Gramicidin ähnlich verhält, ist nicht bekannt.

Tabelle 1. Hämolytische Aktivität wechselnder Tyrocidinhydrochlorid-Gramicidin-Gemische.

Probe Nr.	Tyrocidin-HCl γ/ml	Gramicidin γ/ml	Gramicidin %	Beschaffenheit der Suspension	Als Tyrothricin gef. γ/ml
1	45	—	—	wasserklar	80
2	45	4,5	9,1	„	80
3	45	9,0	16,6	„	90
4	45	22,5	33,3	s. l. Opaleszenz	65
5	45	45	50	deutliche Opaleszenz	54
6	—	200	100	trüb, zum Teil ausgeflockt	—

Die von *Lewis*, *Dimick* und *Feustel*[12] vertretene Ansicht, daß reines Gramicidin zwar hämolytisch relativ schwach wirksam ist, in kleinen Mengen jedoch die hämolytische Tyrocidinwirkung synergistisch beeinflußt, konnte hier nur andeutungsweise bestätigt werden (Tabelle, Probe 3). Auf alle Fälle kann hier auch die Annahme von *Hoogerheide*[13], daß die hämolytische Tyrothricinbestimmung nur Tyrocidin erfaßt, nicht bestätigt werden. *Lewis*, *Dimick* und *Feustel*[12] zeigten jedenfalls an Hand zahlreicher Tyrothricinbestimmungen, daß die im Kulturfiltrat hämolytisch gefundenen Tyrothricinwerte mit genügender Genauigkeit mit der isolierten Menge übereinstimmen. *Dubos* und *Hotchkiss*[14] und *Rammelkamp* und *Weinstein*[15] fanden, daß Tyrocidin in

* Fp. unter Zers. 270° (Heizbank nach *Kofler*). Die Substanz hemmte *S. aureus* in Fleischbouillon noch in der Konz. von 3 γ/ml.

** Gewonnen ebenfalls aus unserem Tyrothricin nach Angaben von *Hotchkiss* und *Dubos*[11]. Fp. 230° (Heizbank nach *Kofler*). Hemmung des *S. aureus* in der Konz. von 0,5 γ/ml (Tyrothricinstandard hemmte bei 0,8 γ/ml in Fleischbouillon).

Gegenwart von 5% Glukose auf Kaninchenerythrozyten hämolytisch wirkt. Gramicidin fanden *Dubos* und *Hotchkiss*[14] bei den gleichen Bedingungen sogar in einer Konzentration von 400 γ/ml nicht wirksam. Nach *Rammelkamp* und *Weinstein*[15] hämolysierte jedoch Gramicidin in physiologischer Kochsalzlösung menschliche Erythrozyten noch in der Konzentration von 1 γ/ml. Laut anschließenden Untersuchungen an der Mayo-Klinik und anderer ist auch Gramicidin mit Sicherheit hämolytisch wirksam; Tyrocidin wirkt zwar schneller, Gramicidin ruft jedoch im Endeffekt einen höheren Grad von Hämolyse als Tyrocidin hervor[16]. Aus diesen Ausführungen ist zu entnehmen, daß Glukose mindestens auf die hämolytische Wirksamkeit des Gramicidins störend wirkt. Eine hemmende Wirkung des Alkohols auf die hämolytische Tyrothricinaktivität wurde von *K. P. Dimick*[3] festgestellt. Auf Grund dieser Angaben erwies sich als notwendig, in eigenen hämolytischen Versuchen stets konstante Mengen an Glukose und Alkohol in den zu testenden Flüssigkeiten herzustellen (3,6% Glukose und 2,5% Alkohol). Es ist noch zu unterstreichen, das Tyrothricin (auch Gramicidin und Tyrocidin allein) durch Ionen ausgeflockt wird und daß parallel zu der Ausflockung ein Wirksamkeitsverlust zu beobachten ist*. Eine Ausflockung findet auch statt, wenn man Tyrothricin nicht in chemisch reiner, sondern in technischer Glukose suspendiert. Auch die Konstanthaltung des p_H ist von Wichtigkeit[17], deshalb empfiehlt es sich, die Hämolyse in gepufferten Medien durchzuführen. Unter Einhaltung aller Vorsichtsmaßnahmen dürfte der Fehler der Bestimmung $\pm 5\%$ nicht überschreiten.

Zusammenfassung.

Es wird eine hämolytische Mikromethode zur Tyrothricinbestimmung beschrieben, die sich an Stelle eines Photo- oder Kolorimeters eines Mikroskops bedient. Die Hämolyse wird durch Beobachtung der Abnahme der Erythrozytenzahl im mikroskopischen Präparat verfolgt. Die Genauigkeit der Methode wird auf $\pm 5\%$ geschätzt. An Hand einer Kurve wird die Temperaturabhängigkeit der durch Tyrothricin hervorgerufenen Hämolyse illustriert. Tyrocidin wirkt stärker hämolytisch als Tyrothricin, seine Wirkung wird jedoch durch größere Gramicidinzusätze geschwächt.

Summary.

A hemolytic micromethod for the determination of tyrothricine, in which a microscope is used in place of a photo- or colorimeter, is described. The curve of the hemolysis is followed by measuring the decrease in the erythrocyte count in the microscopic preparation. The accuracy of the method is estimated at $\pm$ 5%. The temperature-dependence of the hemolysis occasioned by tyrothri-

* Nach *Megay* und *Rotter*[10] soll die durch Elektrolyten wie z. B. NaCl hervorgerufene Ausflockung keinen markanten Abfall der bakteriziden Wirkung hervorrufen.

cine is illustrated by means of a curve. Tyrocidine has a stronger hemolytic action than tyrothricine, however its action is weakened by considerable additions of gramicidine.

Résumé.

On décrit une microméthode hémolytique pour le dosage de la tyrothricine qui utilise un microscope au lieu d'un photocolorimètre. L'hémolyse est suivie par observation de la prise du nombre d'érythrocytes dans la préparation microchimique: la précision de la méthode est estimée à ± 5%. A l'aide d'une courbe, on voit la dépendance entre la température et l'hémolyse provoquée par la thyrothryeine. La tyrocidine agit hémolytiquement plus fortement que la tyrothricine; son action est affaiblie toutefois par de grosses additions de gramicidine.

Diskussion.

H. Prof. *K. Lang* (Mainz, Deutschland): Die Hämolyse durch Tyrothricin dürfte einen anderen Mechanismus haben als eine Saponinhämolyse, die über das Cholesterin wirkt. Tyrothricin dürfte auf Grund seiner chemischen Eigenschaften wohl kaum Cholesterin fällen, da es wasserlöslich ist.

H. *W. Friedrich*: Tyrothricin ist wasserlöslich. Über die Fällbarkeit von Cholesterin mit Tyrothricin wurden keine Versuche angestellt.

H. *H. Höller* (Wien, Österreich): Schon vor fast zehn Jahren wurde von *Schmidt-Thomé* eine Methode der Cholesterinbestimmung mittels der Hämolyse veröffentlicht.

H. *W. Friedrich*: Ich befaßte mich bisher nur mit hämolytischen Eigenschaften des Tyrothricins. Nur von diesem Standpunkt aus wurde von mir die Literatur, betreffend hämolytische Testmethoden, behandelt.

Literatur.

[1] *S. C. Rittenberg, H. E. Sternberg* und *W. G. Bywater*, J. Biol. Chem. **168**, 183 (1947).

[2] *R. J. Dubos* und *R. D. Hotchkiss*, J. Exp. Med. **73**, 629 (1941).

[3] *K. P. Dimick*, J. Biol. Chem. **149**, 387 (1943).

[4] *G. G. Villela* und *A. Cury*, Rev. Brasil. Biol. **5** (3), 361 (1945).

[5] *E. Domanig*, Wien. Klin. Wschr. **59**, 280 (1947).

[6] The Chemist and Druggist **151**, 3593 (1949).

[7] *G. G. Villela* und *A. Cury*, Rev. Brasil. **6** (3), 341 (1946).

[8] *H. W. Florey, E. Chain, N. G. Heatley, M. A. Jennings, A. G. Sanders, E. P. Abraham, M. E. Florey*, „Antibiotics", Oxford University Press. 1949.

[9] *R. D. Hotchkiss*, Advanc. Enzymol. **4**, 153 (1944), zit. nach (8).

[10] *K. Megay* und *K. Rotter*, Mitt. d. Vers.-Anst. f. d. Gärungsgewerbe, Nr. 5/6, S. 56 (1949).

[11] *R. D. Hotchkiss* und *R. J. Dubos*, J. Biol. Chem. **132**, 791 (1940); ebenda **132**, 793 (1940); ebenda **141**, 155 (1941).

[12] *J. C. Lewis, K. P. Dimick* und *J. C. Feustel*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **37**, 996 (1945).

[13] *J. C. Hoogerheide*, Bot. Rev. **10**, 599 (1944), zit. nach (8).

[14] *R. J. Dubos* und *R. D. Hotchkiss*, J. Exp. Med. **73**, 629 (1941).

[15] *C. H. Rammelkamp* und *L. Weinstein*, Proc. Soc. Exp. Biol. **48**, 211 (1941), zit. nach (8).

[16] *Herrel-Schulze*, „Penicillin und andere Antibiotika", Verlag S. Hirzel Stuttgart. 1949.

[17] *E. B. Hendry*, Edinburgh Med. J. **55**, 427 (1948); Chem. Abstr. **43**, 1473 (1949).

Institut für biochemische Technologie und Lebensmittelchemie der Technischen Hochschule Graz.

Zur quantitativen Mikrobestimmung von Aminosäuren in Eiweißkörpern.

Von

G. Gorbach.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 25. Juli 1950.)

Mit der Entwicklung der Biochemie und der ihr verwandten Gebiete, der Lebensmittelchemie und Landwirtschaftschemie, wurde eine allgemein anwendbare Methodik zur Analyse von Eiweißkörpern immer mehr in den Vordergrund des Interesses gerückt. Sind doch die Eiweißkörper als Trägersubstanzen für bestimmte Wirkstoffe verschiedenartig aufgebaut und birgt doch dieser Aufbau vielfach das Geheimnis ihrer oft streng spezifischen Wirkung. Ihre Bausteine, die Aminosäuren, sind mehrfach Stoffwechselfaktoren, bei deren Fehlen die Aufrechterhaltung des normalen Stoffwechsels bei Mensch, Tier und Pflanze nicht mehr möglich ist. Die Lebensmittel- und Futtermittelchemie muß diesen Erkenntnissen Rechnung tragen, nachdem man aus den Arbeiten vornehmlich amerikanischer Forscher[1] weiß, daß in der Nahrung, um geregeltes Wachstum und die Erhaltung des Organismus zu gewährleisten, 8 bis 11 Aminosäuren vorhanden sein müssen, die vom Organismus augenscheinlich nicht aufgebaut werden können.

So kann die lang gewohnte Bestimmung der Eiweißkörper und ihrer Abbauprodukte durch die Gesamtstickstoffbestimmung nach der bekannten *Kjeldahl*-Methode und Multiplikation mit einem empirischen Faktor von 6,25 bzw. 6,35 nicht mehr befriedigen, selbst dann nicht mehr, wenn es sich um sog. technische Analysen handelt.

Seit langem sind Methoden zur Aufteilung der Eiweißkörper in ihre einzelnen Aminosäuren bekannt; die Estermethode nach *E. Fischer*[2], die Butanolextraktion nach *Dakin*[3], die Gruppenaufteilung nach *van Slyke*[4], ferner in neuerer Zeit die kataphoretische Trennung der

Aminosäuren[5] und schließlich die Chromatographie nach *Tswett*, die sich auf Grund neuer und neuester Arbeiten[6] auf einem hohen Stand der Entwicklung befindet und dazu berufen scheint, die obgenannten klassischen Methoden zu verdrängen. Schon heute stellt es eine kaum zu überbietende Leistung dar, wenn es *Consden, Gordon* und *Martin*[7] mit 200 bis 400 γ Protein mit Hilfe der Verteilungschromatographie auf Filtrierpapier gelingt, 22 Aminosäuren nachzuweisen.

Wenn wir nun mit der von uns entwickelten Mikrotechnik auch an die Lösung dieser Fragen herangetreten sind, so deshalb, weil auch zur Anwendung der Chromatographie mikrochemische Einrichtungen allenthalben schon bei der Vorbereitung der Probe notwendig sind, so daß die von uns geleistete Arbeit auch hierfür eine wertvolle Ergänzung sein kann. Anderseits erfordert die Adsorptionstechnik, besonders wenn es sich um die quantitative Auswertung der gegebenen Möglichkeiten handelt, viel Geschick und Einfühlungsvermögen, ein Umstand, der der allgemeinen Verbreitung dieser Methodik in Wissenschaft und Technik hemmend im Wege stehen dürfte. In dem von uns vorgeschlagenen Gang vornehmlich zur Bestimmung der lebenswichtigen Aminosäuren, ist die Adsorption daher nur zur Abtrennung der aromatischen Aminosäuren verwendet worden, die elegant und befriedigend genau durchzuführen ist.

Vorangestellt sei, daß wir bei der Ausarbeitung dieses Analysenganges uns vielfach der Gesamt- und Aminostickstoffbestimmung bedient haben, die wir nach einem neuen Prinzip durchführen. Sie beruht auf der Oxydation der Substanz mittels alkalischer Kaliumpermanganatlösung, wobei das entstehende Ammoniak in die Vorlage abgesaugt wird. Bereits im Jahre 1877 veröffentlichten *J. A. Vanklyn* und *W. J. Cooper*[8] ein Verfahren zur Stickstoffbestimmung in vegetabilischen Substanzen mit dem gleichen energisch wirkenden Oxydationsmittel, ohne daß ihnen allerdings bei der damals angewandten primitiven Arbeitstechnik ein Erfolg beschieden gewesen wäre.

Der Vorteil dieser Arbeitsweise liegt in der bekannt energischen Oxydationswirkung heißer alkalischer Kaliumpermanganatlösung einerseits und in der Verhinderung weiterer Oxydation des entstehenden Ammoniaks anderseits, das während des Entstehens aus dem Reaktionsgemisch entfernt wird und daher keinerlei Nebenreaktionen unterliegt. Dadurch sind manche Fehlerquellen vermeidbar, die bei der unkontrollierbaren Oxydation mit Schwefelsäure nach dem *Kjeldahl*-Verfahren auftreten können. Im Mikroverfahren sind Oxydation und Destillation bereits nach 5 bis 10 Min. beendet und das gleichzeitig in Salzsäure aufgenommene Ammoniak in wenigen Minuten titriert. Im übrigen ähnelt die Arbeitsweise der Urform der *Kjeldahl*-Methode, bei der in saurer Lösung mit Permanganat weiter oxydiert werden kann:

wegen der Gefahr einer Nitratbildung ist dieses Verfahren durch die heute üblichen Modifikationen abgelöst worden. Die von uns vorgeschlagene Methodik wird voraussichtlich überall dort anwendbar sein, wo jetzt die *Kjeldahl*-Methode verwendet wird. Der Anwendungsbereich ist, nach tastenden Vorversuchen zu schließen, wesentlich weiter; insbesondere, wenn durch Zugabe reduzierend wirkender Reagenzien, wie etwa Jodwasserstoffsäure, die Nitratbildung verhindert wird. Auf diese Weise konnten beispielsweise Azoverbindungen einwandfrei bestimmt werden.

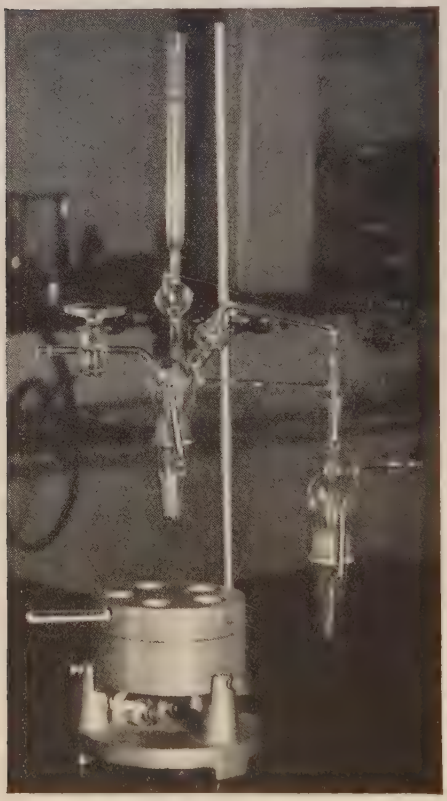


Abb. 1.

Für die Ausführung dieser Schnellmethode hat sich eine Destillationsapparatur bewährt, die sich ganz allgemein für unsere Eiweißanalyse anwenden läßt (Abb. 1). Die Probe wird in ein Schliffspitzröhrchen mit Hilfe unserer Einwägebehelfe an der *Gorbach*schen Torsionswaage eingewogen, was nur wenige Sekunden in Anspruch nimmt, während in ein weiteres, ebenfalls mit Schliff anschließbares Spitzröhrchen je nach Einwaage aus der Nullpunktspipette[9] 1 oder 2 ml n/10-Salzsäure genau gemessen vorgelegt werden.

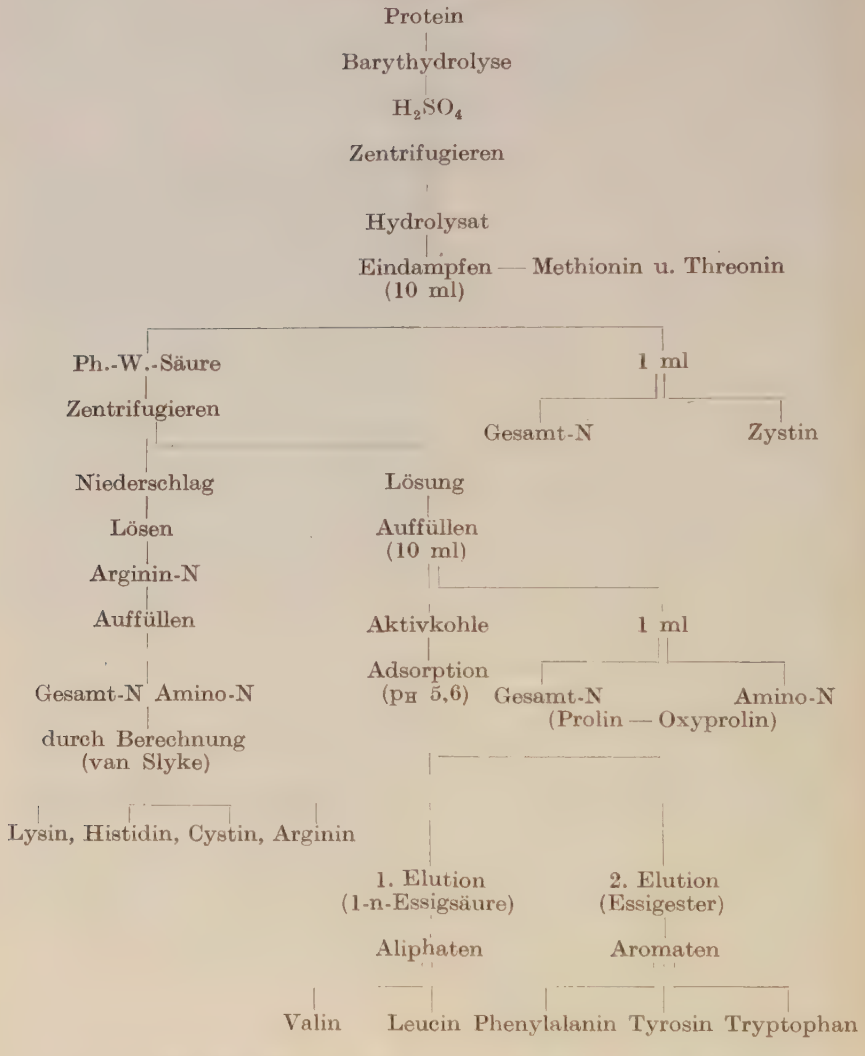
Die gleiche Methodik und gleiche Apparatur ist für die Bestimmung des Aminostickstoffes brauchbar, indem man in bekannter Weise mit salpetriger Säure desaminiert und den restlichen Stickstoff bestimmt. Aus der Differenz gegenüber dem Gesamtstickstoff ergibt sich der Aminostickstoff. Gegenüber den üblichen Methoden, Formoltitration, Titration in alkoholischer Lösung nach *Waldschmidt-Leitz*[10] und der volumetrischen Methode nach *van Slyke* besitzt dieses Verfahren eine höhere Genauigkeit und ist bei Verwendung der Membrannikrobürette für kleinste Aminostickstoffmengen brauchbar.

Zur Bestimmung der einzelnen Aminosäuren wurden zunächst die Eiweißkörper nach bekannten Verfahren isoliert. Für die Prüfung der uns sehr interessierenden biologischen Wertigkeit der Ölsaateneiweißkörper lösten wir diese mittels verdünnter Alkalien aus dem zerkleinerten, durch Extraktion weitgehend entfetteten Material aus. Auf diese Weise lassen sich die Eiweißkörper in ihrer Gesamtheit durch Ausfällen mit verdünnten Säuren und durch öfteres Umfällen auch verhältnismäßig rein gewinnen. Durch Anwendung des von uns entwickelten Mikroautoklaven aus Glas am Universalheizstativ eigener Konstruktion[11] konnte das Problem der Abkürzung der Eiweißhydrolyse auf elegante Weise gelöst werden. Der nach dem Prinzip des *Papin*schen Topfes konstruierte Autoklav ermöglicht nicht nur, unter genauer Kontrolle des Druckes zu hydrolysieren, sondern läßt sich auch bequem öffnen, wodurch die quantitative Weiterverarbeitung der Hydrolysate sehr erleichtert ist. Diese wurden mit dest. Wasser auf ein bestimmtes Maß, meist auf 10 ml verdünnt und aliquote Anteile zu den einzelnen Bestimmungen bzw. zum Trennungsgang herangezogen. Durch die Druckanwendung läßt sich die vollkommene Hydrolyse bei kleinen Eiweißmengen von 300 bis 500 mg mit Schwefelsäure von 24 auf 3 Stunden bzw. mit Barytlauge, die sich wegen der Zerstörung des Tryptophans und teilweisen Zerstörung des Tyrosins durch Schwefelsäure als Hydrolysierungsmittel besser eignet, aber schwächer wirkt, auf 8 Stunden herabsetzen.

Die Zerlegung der Aminosäuregemische erfolgte nach dem untenstehenden Trennungsgang, wonach die basischen Aminosäuren mit Phosphorwolframsäure abgetrennt werden. Zur quantitativen Ermittlung der vier Basen wird zunächst der Arginin-Stickstoff durch Auflösen des Niederschlages im Spitzröhrchen in Natronlauge und Abdestillieren des Ammoniaks in der bereits beschriebenen Mikrodestillationsapparatur bestimmt und in der auf ein bekanntes Volumen gebrachten Lösung nach der Destillation in aliquoten Anteilen der verbleibende Gesamtstickstoff und Aminostickstoff ermittelt. Daraus läßt sich nach *van Slyke*scher Berechnungsart das Arginin, Hystidin und nach einer gesonderten kolorimetrischen Bestimmung des Cystins in einem aliquoten Anteil des ursprünglichen Hydrolysates aus dem restlichen Aminostickstoff das Lysin errechnen.

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag wird mit Barytlauge von Phosphorwolframsäure vollkommen befreit und zur Bestimmung der aromatischen und aliphatischen Aminosäuren verwendet. Zur Abtrennung der ersteren, des Phenylalanins, Tyrosins und Tryptophans ist die von verschiedenen Autoren, besonders von *A. Tisclius*[12] bzw. *Schramm* und *Primosigh*[13] angegebene Adsorption an entsprechend vorbehandelter Aktivkohle sehr gut verwendbar.

Trennungsgang.



Für das Mikroverfahren war es wichtig, daß die quantitative Elution, die mit Ninhydrin geprüft wurde, mit möglichst wenig Flüssigkeit erzielt wird, um konz. Lösungen zu erhalten, die wiederum eine höhere Nachweisempfindlichkeit mittels kolorimetrischer Methoden erlauben. Statt der von *Schramm* und *Primosigh* (l. c.) vorgeschlagenen 5%igen Essigsäure verwenden wir normale Essigsäure entsprechend dem optimalen p_H-Wert von 2,37. Bei Anwendung von 2 g Aktivkohle, die in unserer Mikroapparatur eine Schichthöhe von 7 cm einnehmen, genügen

für das vollkommene Auswaschen der aliphatischen Aminosäuren 50 ml Essigsäure. Die gleichen Gesichtspunkte waren für die nachfolgende quantitative Elution der aromatischen Aminosäuren maßgeblich. Nachdem die bisher vorgeschlagenen Elutionsmittel nicht befriedigten, fanden wir nach verschiedenen vergeblichen Versuchen in einem Gemisch von gleichen Teilen Essigsäure und Essigsäureäthylester ein ausgezeichnetes Elutionsmittel, das ebenfalls mit nur 50 ml vollkommene Elution gestattet.

Zur Bestimmung des Phenylalanins zogen wir die Methode nach *Kapeller-Adler*[14] heran, die bekanntlich auf der Nitrierung des Phenylalanins zu o-Dinitrobenzoesäure beruht, die mit Hydroxylamin und konz. Ammoniak in das tiefblau-violette Salz der o-Diazi-dihydro-dinitrobenzoesäure übergeht (Empfindlichkeit 0,1 mg/15 ml).

Tyrosin und Tryptophan stören diese Reaktion unter Bildung intensiv gelber Verbindungen, daher werden sie zuvor durch eine n/10-Kaliumpermanganatlösung in der Kälte wegoxydiert. Außerdem ist es notwendig, das Elutionsmittel durch Verdampfen im Vakuum zu entfernen. Tyrosin und Tryptophan bestimmen wir nach der Methode von *Tillmans, Hirsch* und *Stoppel*[15] mittels der Xanthoproteinreaktion nebeneinander, deren Gelbfärbung im sauren (p_H 3,2) bzw. alkalischen Gebiet (p_H 11,5) verschieden ist. Als Standardlösung dient eine Lösung von 1 mg m-Nitrophenol in 10 ml n/10-Natronlauge. Für alle kolorimetrischen Bestimmungen dieses Trennungsganges hat sich ein Kapillarkolorimeter eigener Konstruktion, das bei Anwendung kleinster Flüssigkeitsmengen durch die große Schichtdicke hohe Genauigkeit zuläßt, bestens bewährt[16].

Im essigsauren Eluat der aliphatischen Aminosäuren lassen sich schließlich Leucin und Valin durch die verschiedene Oxydationsgeschwindigkeit zu Aceton nach vorheriger Desaminierung mit salpetriger Säure nebeneinander einfach bestimmen. Ein zunächst von *R. J. Block, D. Bolling* und *A. A. Kondritzer*[17] angegebenes Verfahren, das auf der Oxydation mit Kaliumpermanganat einerseits und Kaliumbichromat andererseits beruht, brachte Fehler bis zu 45%.

Jedoch ließ sich die Oxydationsgeschwindigkeit mit einem und demselben Oxydationsmittel in Verbindung mit unserer Destillationsapparatur zur Stickstoffbestimmung zu einem exakten und sehr empfindlichen Mikroverfahren ausbauen. Nach vielen Testversuchen mit den reinen Aminosäuren verhält sich die Oxydationsgeschwindigkeit des Valins zu der des Leucins wie 1 : 4,5 (Permanganat als Oxydationsmittel); unter den von uns gewählten Bedingungen der Mikromethode wird Valin in 25 Min., Leucin in 110 Min. quantitativ zu Aceton oxydiert. Das gebildete Aceton wird kolorimetrisch nach der Methode von *Fabinyi*[18] bestimmt, die auf der Bildung hochgefärbter Komplex-

verbindungen mit Aldehyden (Salicylaldehyd) in Gegenwart konz. Schwefelsäure oder Natronlauge beruht. Methionin und Threonin werden schließlich im ursprünglichen Hydrolysat bestimmt. Als Mikromethode für Methionin haben wir die von *M. Carthy* und *Sullivan*[19] angegebene Bestimmungsweise ausgearbeitet, die auf der Reaktion von Methionin mit Nitroprussidnatrium unter Bildung eines gelben Farbstoffes beruht. Die Reaktion wird in der stark alkalischen Lösung der Arbeitsvorschrift (19,3-n-Natronlauge mit 1%iger Glycerinlösung) von den übrigen Aminosäuren, auch von Histidin, das in schwach alkalischer Lösung eine Gelbfärbung ergibt, nicht gestört. Durch eine Reihe von Maßnahmen, die insbesondere die Verkleinerung der Flüssigkeitsmengen und die Feststellung der Empfindlichkeitsgrenzen betrafen, konnte daraus mit Hilfe unseres Kapillarkolorimeters ein Mikroverfahren erarbeitet werden, das wesentlich genauer (2% statt 10% Fehler) und auf bedeutend kleinere Methioninmengen anspricht. Es konnten besonders durch die von *Block* und *Bolling*[20] — allerdings nur zu Kontrollzwecken — vorgeschlagene „Intensivierung", die in der Zugabe von bekannten Mengen Methionin zur Erhöhung der Farbstärke besteht, noch 46 γ/ml bestimmt werden.

Für das Threonin haben wir die von *Block* und *Bolling*[19] angegebene kolorimetrische Methode verwendet, die auf der Oxydation mit Bleitetraacetat beruht. Der entsprechende Acetaldehyd wird in eine Suspension von p-oxy-Diphenyl in Schwefelsäure eingeleitet, wo bei 0° die Kondensation zu einem kolorimetrisch verwertbaren, intensiv rotvioletten Farbstoff eintritt. Die Reaktion ist außerordentlich empfindlich. Sie ließ sich durch Verwendung unserer Mikrogeräte in kleinen Flüssigkeitsmengen noch wesentlich empfindlicher gestalten. Zur Destillation des Aldehyds läßt sich gleichfalls die Destillationsapparatur zur Stickstoffbestimmung sehr gut verwenden. Die Genauigkeit beträgt ±3%. Es lassen sich noch 45 γ/ml mittels des Kapillarkolorimeters quantitativ erfassen.

Mit Hilfe dieser nur in knappen Zügen angeführten Mikromethodik war es uns möglich, in kürzester Zeit eine Reihe von Samenproteinen, die als Abfallprodukte bei der Speiseölgewinnung anfallen und bislang als Viehfutter Verwendung finden, auf ihre biologische Wertigkeit zu prüfen.

Es ist hier nicht angebracht, auf die interessanten Ergebnisse dieser noch in Gang befindlichen Untersuchungen einzugehen. Es sei nur erwähnt, daß das vielgerühmte Sojaeiweiß hinsichtlich der biologischen Wertigkeit hinter dem Erdnußeiweiß und dieses hinter dem Kürbiskerneiweiß zu reihen ist. Schon lange sind die außerordentlich günstigen Aufzuchts- und Milchleistungsergebnisse bei Verfütterung von Kürbiskernkuchen, die bei der Pressung des Kürbiskernöles aus den

Samen des heimischen Ölkürbis anfallen, bekannt. Durch zweckentsprechende Mischung verschiedener Proteinkörper pflanzlicher Herkunft lassen sich überdies Nährpräparate auf pflanzlicher Basis herstellen, die dem tierischen Eiweiß hinsichtlich der Verdaulichkeit und des Gehaltes an lebenswichtigen Aminosäuren nahekommen und es zum Teil übertreffen.

Ich danke meinen Mitarbeitern, vornehmlich Frau *Löbl*, sowie den Herren *Suppan*, *Kowatsch*, *Balder*, *Laskovic*, *Voitinovici* und *Oberrosler*.

Die für die Ausführung dieser Arbeit erforderlichen Geldmittel wurden in dankenswerter Weise von der steiermärkischen Landeskammer für Land- und Forstwirtschaft und vom Beirat für das technische Versuchswesen des Bundesministeriums für Handel und Wiederaufbau zur Verfügung gestellt.

Zusammenfassung.

Der Verfasser weist auf die Bedeutung der Mikromethoden zur Charakterisierung von Eiweißkörpern hin. Es gelang, durch die Verwendung einer alkalischen Permanganatlösung als Oxydationsmittel, Stickstoffbestimmungen an Hydrolysaten von Eiweißkörpern rascher und exakter als bisher durchzuführen und einen einfachen und systematischen Gang zur Bestimmung der als lebenswichtig erkannten Aminosäuren aufzuzeigen. Der Gang besteht in der Trennung der basischen Aminosäuren mit Phosphorwolframsäure, der Bestimmung der Hexonbasen nach *van Slyke*, der Trennung der aromatischen von den aliphatischen Aminosäuren durch Aktivkohle und der kolorimetrischen Bestimmung dieser Aminosäuren. Die Dauer der Gesamtanalyse beträgt bei Bariumhydroxydaufschluß zirka 13 Stunden, die erforderliche Menge bei Erfassung sämtlicher Aminosäuren etwa 200 bis 300 mg.

Summary.

The importance of micromethods for the characterization of proteins is pointed out. Through the use of an alkaline permanganate as oxidant, the nitrogen content of protein hydrolysates was determined faster and with greater accuracy than heretofore, and a simple and systematic scheme was worked out for the determination of the recognized essential amino acids. The analytical scheme consists of the separation of the basic amino acids by means of phosphotungstic acid, the determination of the hexone bases by the *van Slyke* method, the separation of the aromatic from the aliphatic amino acids by active charcoal, and the colorimetric determination of the amino acids. The complete analysis, when the sample is broken down with barium hydroxide, requires about 13 hours. The quantity required for the inclusion of all the amino acids is around 200 to 300 mg.

Résumé.

L'auteur souligne l'importance des microméthodes pour caractériser les protéines. On y arrive par emploi d'une solution alcaline de permanganate comme oxydant pour effectuer les dosages d'azote dans les hydrolysats de protéines plus rapidement et plus exactement que par les méthodes déjà connues; on indique un mode opératoire simple et systématique pour le dosage des amino-acides connus comme indispensables à la vie. La marche comporte la séparation des amino-acides basiques avec l'acide phosphotungstique, le dosage des bases hexoniques d'après *van Slyke*, la séparation par le charbon activé des amino-acides aromatiques et aliphatiques et le dosage colorimétrique de ces amino-acides. La durée globale de l'analyse est d'environ 13 heures par la destruction à la baryte; la quantité nécessaire pour la détermination de tous les amino-acides est d'environ 200—300 mg.

Diskussion.

H. *W. Prodinger* (Wien, Österreich): Wie wird bei der Ammoniakbestimmung der Luftstrom gereinigt?

H. Prof. *G. Gorbach*: Wie üblich mit Schwefelsäure und nachgeschalteter Wasserflasche.

H. *W. Ruziczka* (Wien, Österreich): Könnte nicht das unterschiedliche Verhalten von Aminosäuren bei der acidimetrischen und jodometrischen Titration [siehe Z. analyt. Chem. **126**, 95 (1943)] auch zur quantitativen Mikrobestimmung von Aminosäuren beitragen?

H. Prof. *G. Gorbach*: Wir haben diesbezüglich keine Erfahrungen sammeln können.

H. *E. Stocker* (Horn, Schweiz): Ist die Anwendung mikrochemischer Schnellverfahren bei textilchemischen Prozessen zur exakten Kontrolle aller Textilveredlungsprozesse möglich? Ein besonderes Anliegen wären Testmethoden, um festzustellen, ob mittels Aminoplasten (Harnstoff-Formaldehyd-Kunststoffen) knitterfest gemachte Gewebe bei feuchter Lagerung dazu neigen, Fischgeruch (Trimethylamin) anzunehmen.

H. Prof. *G. Gorbach*: Diese Aufgabe ist mit unseren neuen Mikromethoden sicherlich lösbar.

Literatur.

[1] *W. C. Rose*, The nutritive significance of the amino acids. Physiologic. Rev. 18 (1938). — *W. C. Rose* und *E. Rice*, Science **90**, 186 (1940).

[2] *E. Fischer*, Untersuchungen über Aminosäuren Polypeptide und Proteine, Julius Springer Berlin. 1909.

[3] *D. D. Dakin*, Biochemic. J. **12**, 290 (1918); Z. physiol. Chem. **130**, 159 (1923).

[4] *D. D. van Slyke*, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 7, S. 66.

[5] *W. Graßmann* und *K. Riederle*, Biochem. Z. **284**, 177 (1936).

[6] *F. Turba*, Z. Vitamin-, Hormon- und Fermentforsch. **2**, 49 (1948).

[7] *R. Consden*, *A. H. Gordon* und *A. J. P. Martin*, Biochemic. J. **38**, 224 (1944).

[8] *J. A. Vanklyn* und *W. J. Cooper*, Jahresberichte f. d. Fortschritt d. Chemie 1877.

[9] *G. Gorbach*, Mikrochem. Praktikum, Selbstverlag 1949, S. 74.

[10] *E. Waldschmidt-Leitz*, Ber. dtsch. chem. Ges. **54**, 2988 (1921); in *Bertho-Graßmann*, Biochem. Praktikum S. 56, Berlin. 1936.

[11] *G. Gorbach*, Mikrochem. **34**, 181 (1948).
[12] *A. Tiselius*, Fortschritte der Proteinchemie, Bd. III (1947).
[13] *G. Schramm* und *J. Primosigh*, Ber. dtsch. chem. Ges. **76**, 373 (1943); **77**, 417 (1944); **77**, 420 (1944); **77**, 426 (1944).
[14] *R. Kapeller-Adler*, Biochem. Z. **252**, 184 (1930).
[15] *J. Tilmans*, *P. Hirsch* und *F. Stoppel*, Biochem. Z. **198**, 379 (1928); **217**, 422 (1930).
[16] *G. Gorbach*, Mikrochemisches Praktikum, Selbstverlag Graz 1949, S. 102.
[17] *R. J. Block*, *D. Bolling* und *A. A. Kondritzer*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **45**, 289 (1940).
[18] *R. Fabinyi*, Acetonbestimmung, D. R. P. 110520 (F 10806) Kl. 22.
[19] *T. E. Mc. Carthy* und *M. X. Sullivan*, J. Biol. Chem. **142**, 871 (1941).
[20] *R. J. Block* und *D. Bolling*, J. Biol. Chem. **130**, 365 (1939).

Eidgenössische milchwirtschaftliche und bakteriologische Anstalt Liebefeld, Bern.

Kolorimetrische Bestimmung kleiner Mengen von Nitrit und Nitrat in eiweißhaltigen Stoffen.

Von

H. Hänni.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

Die quantitative Erfassung kleiner Nitratmengen bietet bei Gegenwart von Eiweißstoffen und deren Abbauprodukten besondere Schwierigkeiten. Methoden, die auf der Reduktion des Nitrates zu Ammoniak beruhen, sind wegen des Vorhandensens leicht abspaltbarer Aminogruppen und freien Ammoniaks unbrauchbar. Der Nachweis mit Diphenylamin-Schwefelsäure läßt sich nur mit Mühe quantitativ gestalten und erweist sich als sehr störungsempfindlich. Die andern kolorimetrischen Verfahren, bei denen als Reagens Phenol oder Natriumsalicylat oder Naphtholsulfosäure Verwendung finden, werden durch Eigenfärbungen der Eiweißabbauprodukte gestört. Da sämtliche für den mikrochemischen Nitratnachweis in Frage kommenden Reaktionen unspezifisch sind, muß vorhandenes Nitrit zerstört werden. Auch hierbei zeigen sich wieder Schwierigkeiten, indem sich unter Umständen durch Oxydation von Nitrit zur höheren Oxydationsstufe beträchtliche Mengen von Nitrat bilden, wenn nicht besondere Bedingungen eingehalten werden.

Die im folgenden kurz zu beschreibende Methode wurde im Hinblick auf die Bestimmung kleiner Mengen von Nitrit und Nitrat in Milch und Milchprodukten ausgearbeitet. Sie dient zur Abklärung der Ursachen gewisser Käsefehler sowie zum Nachweis der Wässerung von Milch. Sie ist indessen ganz allgemeiner Anwendung fähig und dürfte überall dort mit Vorteil angewendet werden, wo die zu untersuchenden Stoffe Eigenfärbungen aufweisen oder wo Chloride vorhanden sind, welche bei den üblichen kolorimetrischen Verfahren stören.

I. Die Bestimmung von Nitrit.

Als Grundlage dient die Methode von *Jendrassik* und *Falcsik-Szabó*[1]. Die eiweißhaltigen Proben werden in 2-n-Natronlauge gelöst und durch Zugabe von 20%iger Aluminiumsulfatlösung flockig ausgefällt. Die beiden Reagenzien müssen so aufeinander eingestellt werden, daß weder ein Unter- noch ein Überschuß von Aluminiumsulfat zur Anwendung kommt, sonst gestaltet sich die nachfolgende Filtration schwierig. Man bestimmt deshalb in einem Vorversuch unter Verwendung von Methylrot als Indikator, wieviel Aluminiumsulfat zur Neutralisation der angewendeten Menge Natronlauge nötig ist. Vom Filtrat der Fällung wird ein aliquoter Teil mit gleichen Teilen einer Lösung von Atoxycocain in Essigsäure und α-Naphthylamin in Essigsäure versetzt. Es bildet sich eine rote Färbung, die in 40 Min. das Maximum erreicht. Sie wird im *Pulfrich*-Photometer mit Hilfe des Filters S 53 gemessen. Die Erfassungsgrenze liegt bei 0,8 γ NO_2'.

II. Die Bestimmung von Nitrat.

Die zu untersuchende Probe wird in ein 50-ml-Meßkölbchen eingewogen. Jetzt muß sofort die Zerstörung von Nitrit vorgenommen werden, weil sonst stets zu hohe Nitratwerte resultieren. Zu diesem Zwecke wird die Probe tropfenweise mit 2-n-H_2SO_4 angesäuert bis zum Umschlag von Bromkresolgrün und mit 1 ml 1%iger Lösung von Natriumazid versetzt. Man schüttelt kräftig und läßt 30 Min. stehen. Nach dieser Zeit gibt man 2-n-NaOH zu, bis sich die Eiweißstoffe vollständig lösen. Nun wird aus einer Bürette unter kräftigem Schütteln 20%ige Trichloressigsäurelösung in kleinen Anteilen zugesetzt. Die Ausfällung der Eiweißstoffe muß sehr feinflockig erfolgen, andernfalls wird ein Teil des Nitrates in den sich bildenden Klumpen eingeschlossen. Nach beendeter Fällung gibt man noch 2 bis 3 ml Trichloressigsäure zu, füllt mit dest. Wasser zur Marke auf, schüttelt nochmals kräftig und filtriert durch ein 11-cm-Weißbandfilter. Vom Filtrat werden 25 ml in ein 100-ml-Weithals-*Erlenmeyer*-Kölbchen pipettiert und mit reinstem Ammoniak alkalisch gemacht. Die Lösung wird bis zur völligen Trockenheit eingedunstet.

Zum Rückstand gibt man 1 ml Wasser, zwei kleine gereinigte Glasperlen und zwei Tropfen reinstes 2,4-Xylenol. Reinstes Xylenol ist Bedingung für die Brauchbarkeit der Methode. Gelbgefärbte Handelsprodukte sind vollständig wertlos. Wir haben farbloses Reagens aus technischem m-Xylidin selbst hergestellt.

Nachdem sich der braune Rückstand gelöst hat, fügt man 5 ml 75%ige (v/v) Schwefelsäure zu, in der 54 g Silbersulfat pro Liter gelöst wurden. Vorhandene Chloride werden durch dieses Reagens augen-

blicklich gefällt. Es gelingt wegen der Schutzwirkung der Proteinstoffe nicht, sie auf andere Weise unschädlich zu machen.

Der Kolben wird sofort mit einem gut dichtenden Gummistopfen versehen, vorsichtig umgeschwenkt und während 10 Min. bei gewöhnlicher Temperatur stehengelassen. Das 2,4-Xylenol wird vom vorhandenen Nitrat zur 6-Nitro-Verbindung umgesetzt. Man verdünnt das Gemisch mit 20 ml Wasser und schließt das Kölbchen an einen kleinen Destillierapparat an.

Da bei der Destillation fast immer starke Schaumbildung eintritt, wurde im Ableitungsrohr über dem Kolben eine Kugel vorgesehen. Hier entmischen sich Flüssigkeit und Blasen, so daß das Destillat

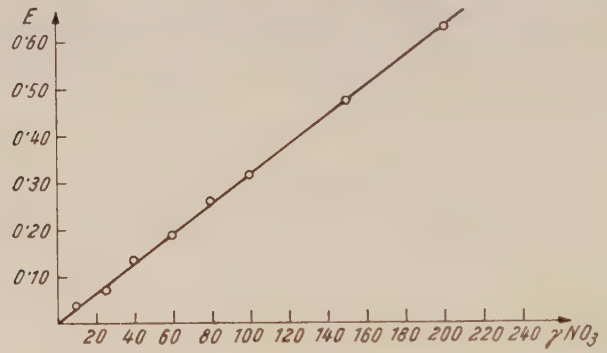


Abb. 1.

rein bleibt. Als Vorlage dient ein 15-ml-Meßkölbchen, das mit 2 ml n-Natriumlauge beschickt ist. Die Natronlauge enthält 10% Natriumsulfit, welches verhindert, daß die alkalische Lösung vor und während der Messung durch Oxydation dunkler wird. Das überdestillierende Nitroxylenol nimmt in der Vorlagelösung eine tiefgelbe Färbung an. Man füllt mit Wasser zur Marke auf und mißt die Extinktion im *Pulfrich*-Photometer mit Hilfe des Filters S 47. In die parallele Küvette kommt eine Vergleichslösung, die alle Reagenzien in gleicher Menge enthält. Bei Verwendung der Küvetten von 0,5 bis 5 cm Schichtdicke lassen sich Nitratmengen von 4 bis 200 γ bestimmen. (Eichkurve s. Abb. 1.)

Zusammenfassung.

Die bei der kolorimetrischen Bestimmung kleiner Mengen von Nitrit und Nitrat in eiweißhaltigen Stoffen auftretenden Schwierigkeiten lassen sich durch geeignete Maßnahmen beseitigen. Die Erfassungsgrenze liegt bei 0,8 γ für Nitrit und bei 4 γ für Nitrat. Das Verfahren läßt sich ebensogut auf andere Stoffe anwenden.

Summary.

The difficulties arising in the colorimetric determination of small amounts of nitrites and nitrates in albuminous matters can be eliminated by appropriate measures. The limiting amounts are 0.8 γ for nitrites and 4 γ for nitrates. The proceeding may be applied to other substances as well.

Résumé.

Les difficultés qui se présentent à la détermination colorimétrique de petites quantités de nitrite et de nitrate dans les matières albumineuses peuvent être éliminées par des mesures appropriées. La valeur-limite est de 0,8 γ pour le nitrite et de 4 γ pour le nitrate. Le procédé est aussi bien applicable à d'autres matières.

Literatur.

[1] *L. Jendrassik* u. *E. Falcsik-Szabó*, Biochem. Z. **261**, 110 (1933).

Zentralanstalt für Getreideverarbeitung, Detmold.

Die quantitative Analyse von Zuckergemischen auf kolorimetrischem Wege.

Von

H. Rüggeberg.

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

Für viele praktische und theoretische Zwecke ist die Bestimmung verschiedener Zuckerarten nebeneinander von erheblicher Bedeutung. Die Lösung dieser Aufgabe ist deshalb immer wieder auf verschiedenen Wegen versucht worden. Aber schon die große Zahl der Veröffentlichungen, die sich mit dieser Aufgabe beschäftigen, beweist, daß noch immer keine allgemein befriedigende Lösung gefunden worden ist. Der Grund dafür ist in der Tatsache zu suchen, daß die wichtigsten Bestimmungsmethoden auf der Reduktionskraft der Zucker beruhen; da aber die Reduktionspotentiale sich nicht so weit voneinander unterscheiden, daß sie mit Hilfe spezifischer Reagenzien exakt erfaßt werden könnten, treten immer Überschneidungen auf. Einen großen Fortschritt bedeuten daher die mikrobiologischen Methoden, mit deren Hilfe es gelingt, Zuckergemische recht genau zu analysieren; jedoch schließt die äußerst diffizile Versuchstechnik deren Verwendung in der Praxis aus. Für die Zukunft wird der konsequente Ausbau der Papierchromatographie weitere Fortschritte bringen. Allerdings steckt die lange Dauer eines solchen Versuches ebenfalls ihrer praktischen Anwendung Grenzen.

Die vorliegenden Untersuchungen hatten zum Ziel, vor allem der Praxis eine Methode zu liefern, die es gestattet, mit genügender Genauigkeit und in relativ kurzer Zeit — auch in laufenden Kontrollen — die Zusammensetzung von Zuckergemischen zu ermitteln. Wir hatten dabei besonders die Stärkesyrupindustrie im Auge, so daß die Methode speziell die Bestimmung von Maltose, Glukose und Dextrin nebeneinander betrifft. Einige orientierende Versuche zeigten, daß im Prinzip auch andere Kohlenhydratmischungen auf die gleiche Weise analysiert

werden können. Der sehr geringe Substanzbedarf (für die Bestimmung genügen insgesamt 6 bis 15 mg) macht die Methode auch für die Bearbeitung manchen wissenschaftlichen Problems brauchbar.

Bei der Beurteilung von Stärkesirup beschränkte man sich bisher darauf, neben dem Trockensubstanzgehalt den Reduktionswert, ausgedrückt als Prozent Glukose, als Maß für den Abbaugrad anzugeben. Mehr und mehr hat sich jedoch ein Bedürfnis herausgestellt, auch über das Verhältnis der verschiedenen Zuckerarten zueinander Genaueres zu kennen, da dieses Verhältnis von großem Einfluß auf die Verwendbarkeit des Sirups in seinen verschiedenen Verarbeitungszweigen ist. Hierfür wurde fast ausschließlich die Methode von *Steinhoff*[1] bzw. ihre Verbesserung nach *Sichert* und *Bleyer*[2] benutzt. Sie beruht auf der Anwendung einer Natriumacetatlösung an Stelle von Seignettesalz bei der Kupfersalzreaktion nach *Fehling*, wobei angeblich nur die Monosaccharide erfaßt werden sollen. Diese Methode arbeitet jedoch nach unseren Feststellungen nicht ganz zuverlässig, weil der Glukosewert besonders bei ungünstigem Maltose-Glukose-Verhältnis stets zu hoch gefunden wird; ferner stören auch geringe Mengen Proteine, welche aus der verwendeten Stärke in den Sirup übergehen.

Es fehlte auch nicht an Versuchen, auf anderen Wegen das erstrebte Ziel zu erreichen. Erwähnt sei die Arbeit von *Tryller*[3], der eine graphische Auswertung von polarimetrischen Messungen vorschlägt, sowie die von *Fincke*[4], wobei ebenfalls die optische Drehung nach verschiedener Vorbehandlung herangezogen wird.

Mit der Anwendung kolorimetrischer Methoden hat sich ebenfalls bereits eine beträchtliche Anzahl von Arbeiten beschäftigt, denn diese Methoden bieten von vornherein den Vorteil der einfachen und schnellen Handhabung sowie eines geringen Substanzbedarfs. In der Literatur finden sich mehrere Tabellen, in denen die Reduktionskraft verschiedener Zuckerarten gegen bestimmte Reagenzien verglichen wird (z. B. *Poe* und *Klemme*[5]). Hierbei erweist sich, daß die Unterschiede bei allen Reagenzien keineswegs gleich sind. Diese Tatsache wurde von uns ausgenützt, indem wir zwei Reagenzien suchten, die gegen Glukose und Maltose in möglichst unterschiedlichem Ausmaß ansprechen. Wir fanden sie in der 3,5-Dinitrosalicylsäure einerseits und dem Phosphorammoniummolybdat anderseits. Die 3,5-Dinitrosalicylsäure wurde erstmalig von *Sumner*[6] angewandt, besonders zur Zuckerbestimmung in biologischem Material. Sie leistete dann in der Hand von *K. H. Meyer*[7] sowie *Myrbäck* wertvolle Dienste bei der Endgruppenbestimmung in Dextrinen zu deren Konstitutionsaufklärung. Sie ergibt mit reduzierenden Zuckern (bzw. reduzierenden Endgruppen) eine braunrote Färbung, deren Intensität der Konzentration innerhalb eines genügend großen Bereichs proportional ist.

Benham und *Petzing*[8] geben eine Methode an zur gleichzeitigen Bestimmung von Glukose und Maltose in Mischungen. Sie benützen dazu Phosphorammoniummolybdat und bestimmen die Extinktion der Lösung vor und nach der Hydrolyse. Dabei machen sie sich die Tatsache zunutze, daß nur Monosaccharide mit diesem Reagens starke Blaufärbung ergeben, Maltose jedoch eine rund zehnmal geringere Färbung erzeugt. Der Farbzuwachs nach der Hydrolyse ist also ein Maß für die Maltosemenge, die bei der Spaltung in Glukose übergegangen ist. In Anwesenheit von höheren Kohlenhydraten führt jedoch selbstverständlich diese Methode zu völlig falschen Werten, so daß sie in diesen Fällen nicht angewandt werden kann. Ferner muß man beachten, daß das Phosphorammoniummolybdat ein recht unspezifisches Reagens ist, da es auch mit zahlreichen anderen reduzierenden Substanzen unter Blaufärbung reagiert. Dieser Nachteil aber fiel für die von uns untersuchten Fälle nicht ins Gewicht und wurde durch den Vorteil, den die äußerst geringe Beteiligung der Maltose und die völlige Indifferenz der Dextrine bietet, voll aufgewogen.

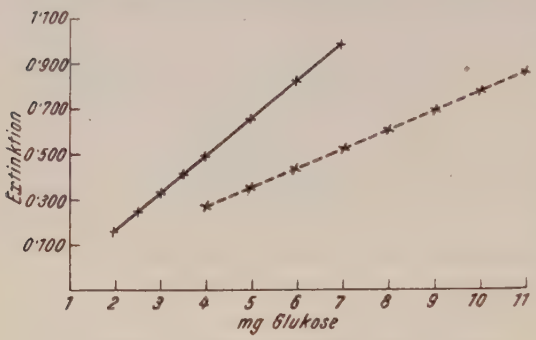


Abb. 1. Eichkurve zur Glukosebestimmung mit 3,5-Dinitrosalizylsäure.
x——x——x——x Schichtdicke 2 cm,
x - - - x - - - x - - - x Schichtdicke 1 cm.

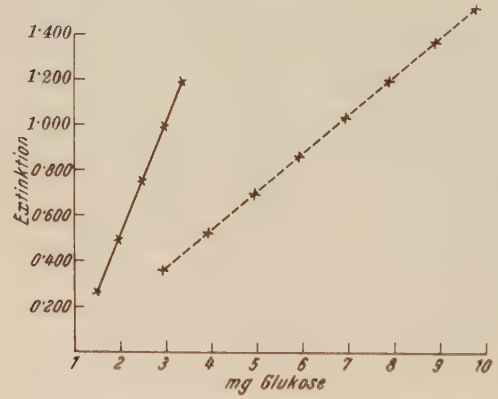


Abb. 2. Eichkurve zur Glukosebestimmung mit Ammoniummolybdat.
x——x——x——x Schichtdicke 5 cm,
x - - - x - - - x - - - x Schichtdicke 2 cm.

Die Anwendbarkeit unserer Methode wurde zunächst an reinen Glukose-Maltose-Mischungen geprüft. Die genaue Arbeitsweise wird im experimentellen Teil beschrieben. Der Gang der Analyse läßt sich kurz wie folgt darstellen.

Die zu untersuchenden Lösungen, die zwischen 2 und 10 mg Zucker enthalten sollen, wurden zunächst mittels Dinitrosalicylsäure und dar-

auf mit Phosphorammoniummolybdat kolorimetriert, wobei als Standard jeweils 1 mg Glukose verwendet wurde. Aus Eichkurven bzw. mit Hilfe von Eichfaktoren wurden die zugehörigen Glukosewerte gewonnen, deren Auswertung nach folgender Überlegung möglich ist. Tabelle 1

Tabelle 1. Reduktionskraft der Maltose gegenüber Dinitrosalizylsäure (*A*) und Ammoniummolybdat (*B*), bezogen auf Glukose.

mg Maltose	*A*	*B*
2	2,15	(0,30)
4	4,26	(0,34)
6	6,30	0,42
8	8,38	0,57
10	(9,91)	0,72
12	—	0,81
14	—	0,97
Mittelwert für 1 mg Maltose	1,05	0,07

gibt einen Überblick über die Beteiligung der Maltose bei der Farbentwicklung in beiden Fällen. Danach verhält sich 1 mg Maltose gegen Dinitrosalicylsäure wie 1,05 mg Glukose, gegen Phosphorammoniummolybdat dagegen nur wie 0,07 mg Glukose.

Somit gelten für die Extinktion folgende Gleichungen:

$A = g + 1{,}05\,m$ A = Extinktion mit Dinitrosalicylsäure,
$B = g + 0{,}08\,m$ B = Extinktion mit Phosphorammoniummolybdat

$$m = \frac{A - B}{0{,}97}$$

g = mg Glukose
$g = A - 1{,}05\,m$ m = mg Maltose

Die Ergebnisse aus einer Reihe von Mischungen mit verschiedenem Glukose-Maltose-Verhältnis sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2. Analysenergebnisse an Mischungen von Glukose und Maltose.

mg Glukose	mg Maltose	*A*	*B*	mg Glukose	mg Maltose
gegeben				gefunden	
4	—	4,00	3,96	3,96	0,04
6	—	5,99	5,95	5,94	0,05
—	4	4,07	0,30	0,04	3,91
—	6	6,18	0,43	0,02	5,98
3	2	5,03	2,88	2,87	2,10
2	3	5,08	2,00	1,92	3,12
1	5	6,12	1,37	1,04	4,93
5	1	6,01	4,89	4,93	1,05

Die Übereinstimmung ist durchwegs gut und überschreitet einen Fehler von ± 5% nicht (die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils drei Bestimmungen, die gleichzeitig angesetzt wurden). Der durchschnittliche mittlere Fehler beträgt ± 2,9%.

Bei der Ausdehnung der Methode auch auf die Bestimmung der Dextrine, z. B. in einem Stärkesirup, ergibt sich eine prinzipielle Schwierigkeit durch die Heterogenität der in Frage stehenden Fraktion. Es ist noch keine Methode bekannt, die mit Sicherheit erlaubt, den Kohlenhydratanteil, der nicht Glukose und Maltose ist, exakt zu bestimmen. Jede Methode erfaßt einen anderen Anteil und führt somit auch zu anderen Werten. Es ist also schwierig, den Anteil der Dextrine bei der Farbbildung mit den beiden Reagenzien zu ermitteln. Wir haben deshalb aus einem Sirup durch Alkoholfällung die Polysaccharide ausgefällt und nach mehrfacher Umfällung und Reinigung untersucht. Dabei verhielt sich 1 mg dieser Fraktion gegen Dinitrosalicylsäure wie 0,63 mg Glukose, gegen Phosphorammoniummolybdat sprach sie nicht merklich an. Damit ist die Möglichkeit zur Bestimmung der Dextrine, wenn man sie als den alkoholfällbaren Anteil definieren will, gegeben. Man benötigt nur noch den Glukosegehalt der Lösung nach völliger Aufspaltung aller Kohlenhydrate zu Glukose. Dieser Wert *(C)* wird ebenfalls kolorimetrisch mit Dinitrosalicylsäure aus dem Säurehydrolysat des Sirups bestimmt. Man erhält nun für die Werte A, B und C folgende Formeln:

$$A = g + 1{,}06\,m + 0{,}63\,d,$$
$$B = g + 0{,}08\,m,$$
$$C = g + 1{,}05\,m + 1{,}1\,d.$$

Die Auflösung nach den gesuchten Größen d, m und g ergibt:

$$d = \frac{C - A}{0{,}48},$$
$$m = \frac{A - B}{0{,}97} - 0{,}65\,d,$$
$$g = B - 0{,}08\,m.$$

Die Anwendung der Methode auf künstlich hergestellte Gemische von Glukose, Maltose und Dextrin obiger Definition zeigte das in Tabelle 3 dargestellte Ergebnis.

Tabelle 3. Analysenergebnisse an künstlichen Mischungen von Glukose, Maltose und Dextrin.

mg Glukose	mg Maltose	mg Dextrin	α ber.	mg Glukose	mg Maltose	mg Dextrin	α gef.
gegeben				gefunden			
1	1	2	2,04	1,04	0,95	2,04	2,10
2	1	1	1,59	2,09	0,90	1,04	1,55
1	2	1	1,42	1,06	1,97	0,98	1,40

Leider wird durch die Rechnung die Methode sehr empfindlich gegen nur geringe Bestimmungsfehler, so daß nun der auftretende Gesamtfehler in einigen Fällen an 10% herankam. Der mittlere Fehler aber lag noch immer bei ± 4% und ist somit für den beabsichtigten Zweck erträglich. Schließlich sind in Tabelle 4 einige Analysenergebnisse von Sirupen verschiedener Herkunft zusammengestellt.

Tabelle 4. Analysenergebnisse an einigen Stärkesirupen (in %).

Art des Sirups	Glukose	Maltose	Dextrose	H_2O	Summe	$[\alpha]_D^{20}$ ber.	$[\alpha]_D^{20}$ gef.
Kapillärsirup . .	23,0	34,8	26,9	17,6	101,7	113,0° (102,7°)	105,5°
Bonbonsirup . .	19,5	30,8	31,3	17,2	98,6	114,1 (101,4)	105,6°
Glukose 43° . . .	31,7	22,7	30,2	17,1	101,7	106,6 (95,0)	101,5°
Stärkemaltose .	26,0	41,8	15,2	17,4	100,4	100,6 (94,9°)	98,5°

Eine Kontrolle der Richtigkeit ist — und auch das mit einigem Vorbehalt — nur durch die optische Drehung möglich. Deshalb sind die Werte der spezifischen Drehung den aus den Analysen errechneten gegenübergestellt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß für die Dextrine gewöhnlich, und auch in unserer Rechnung, eine spezifische Drehung von 190° angenommen wird, während das von uns isolierte Dextrin, auf das die benutzten Faktoren bezogen sind, eine Drehung von 156° aufweist. Deshalb ist es nicht zu verwundern, wenn der berechnete Wert stets etwas über dem gefundenen liegt.

Die von uns hergestellten Mischungen zeigten dagegen keine wesentlichen Abweichungen von den berechneten Werten (in der Tabelle in Klammern gesetzt), wenn man die spezifische Drehung des Dextrins mit 156° ansetzt.

Genaue Analysenvorschrift.

1. Eine abgemessene Menge der Zuckerlösung, die möglichst zwischen 2 und 10 mg enthalten soll, wird in einem 25-ml-Meßkölbchen mit 15 ml der Reagenslösung nach *Summer*[6] versetzt. Das Kölbchen wird bis zur Marke aufgefüllt und genau 10 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Darauf wird in kaltem Wasser 10 Min. gekühlt und der Inhalt des Kölbchens in einen 100-ml-Meßkolben überführt. Nach Auffüllen und Umschütteln wird mit Filter S 50 gegen eine gleichbehandelte Standardlösung mit 1 mg Glukose kolorimetriert.

$$\frac{\text{Extinktion}}{\text{ml Lösung}} \times \text{Eichfaktor} + 1 = A.$$

2. Eine weitere, etwa gleiche Menge der Zuckerlösung wird in einem 25-ml-Meßkölbchen mit 5 ml einer 0,02%igen Lösung von NaH_2PO_4 und 10 ml einer 7,5%igen Ammoniummolybdatlösung versetzt. Nach Auffüllen bis zur Marke wird 40 Min. lang im siedenden Wasserbad erhitzt, darauf 10 Min. in kaltem Wasser (besser Eiswasser) gekühlt. Nach Korrektion des Volumens wird wiederum gegen 1 mg Glukose-Standard mit Filter S 72 kolorimetriert.

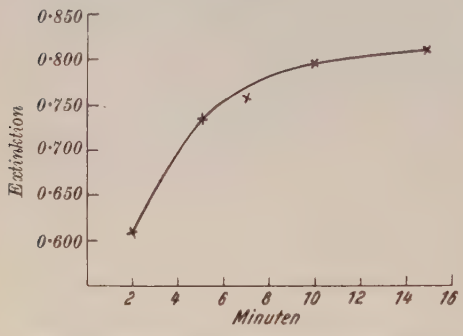


Abb. 3. Abhängigkeit der Farbentwicklung von der Zeit mit Dinitrosalizylsäure (je 4 mg Glukose).

$$\frac{\text{Extinktion}}{\text{ml Lösung}} \times \text{Eichfaktor} + 1 = B.$$

3. Eine weitere Menge wird inzwischen durch dreistündiges Kochen mit 2,5%iger Salzsäure hydrolysiert, das Hydrolysat neutralisiert und auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Ein aliquoter Teil wird sodann wie unter 1. kolorimetriert. Man erhält unter Berücksichtigung der Verdünnung den Wert C (bezogen auf 1 ml Ausgangslösung).

Die Auswertung der Messungen erfolgt nach obigen Gleichungen. Die Dauer einer Bestimmungsserie, die leicht zehn Bestimmungen umfassen kann, beträgt mit Einschluß der Hydrolyse $3^1/_2$ Stunden. Liegt das Hydrolysat bereits vor, kann die Serie bei geeigneter Zeiteinteilung in $1^1/_2$ bis 2 Stunden gut erledigt werden. Eine Abkürzung der Zeit wäre nur durch eine kürzere Erhitzungsdauer möglich. Die Abb. 3 und 4 aber zeigen, daß dieser Weg die Fehlermöglichkeiten stark erhöhen würde; denn die Farbentwicklung mit der Zeit ist erst nach der angegebenen Erhitzungsdauer genügend flach. Wir mußten daher auch in beiden Fällen die Erhitzungszeiten, die in den Originalmethoden von *Sumner*[6] bzw. *Benham*[7] angegeben sind, etwas verlängern.

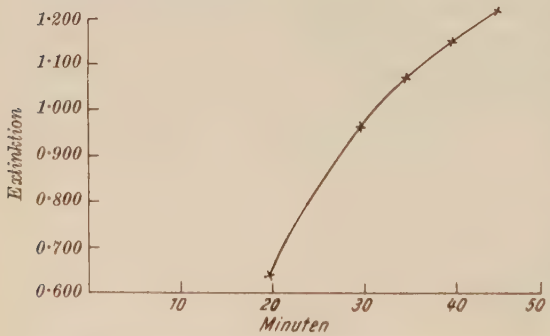


Abb. 4. Abhängigkeit der Farbentwicklung von der Zeit mit Ammoniummolybdat (je 3 mg Glukose).

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode beschrieben, die es gestattet, kleine Mengen eines Gemisches von Glukose, Maltose und Dextrinen zu analysieren. Sie besteht in der Kombination zweier kolorimetrischer Methoden, die auf die Zuckerarten in verschiedenem Ausmaß ansprechen. Als Reagenzien werden 3,5-Dinitrosalicylsäure und Phosphorammoniummolybdat verwendet. Die Methode arbeitet mit einem durchschnittlichen Fehler von $\pm 4\%$.

Summary.

A method was described for the analysis of small quantities of a mixture of glucose, maltose and dextrins. It consists of a combination of two colorimetric methods, that respond to these types of sugars to a different extent. 3,5-dinitro salicilic acid and ammonium phosphomolybdate are the reagents. The method works with an average error of $\pm 4\%$.

Résumé.

On décrit une méthode qui permet d'analyser de petites quantités d'un mélange de glucose, maltose et dextrines. Elle repose sur l'emploi combiné de deux méthodes colorimétriques qui intéressent les différents sucres, en proportions variées. Comme réactif, on emploie l'acide dinitro-3,5 salicylique et le phosphomolybdate d'ammonium. La méthode donne une précision moyenne de $\pm 4\%$.

Literatur.

[1] *G. Steinhoff*, Z. Spiritusind. **56**, 12, 64 (1933).
[2] *K. Sichert* und *B. Bleyer*, Z. analyt. Chem. **108**, 328 (1936).
[3] *H. Tryller*, Z. Lebensm.-Unters. und -Forsch. **88**, 616 (1948).
[4] *H. Fincke*, Zucker- und Süßw.-Wirtsch. **3**, 9, 3 (1950).
[5] *C. F. Poe* und *D. Klemme*, J. Biol. Chem. **87**, 7 (1930).
[6] *J. B. Sumner*, J. Biol. Chem. **65**, 393 (1925). — *J. B. Sumner* und *S. F. Howell*, J. Biol. Chem. **108**, 51 (1935).
[7] *K. H. Meyer*, *P. Bernfeld*, *R. A. Boissanas*, *P. Gürtler* und *G. Noelting*, J. Physic. Coll. Chemistry, **53**, 3, 319 (1949).
[8] *G. H. Benham* und *V. E. Petzing*, Analyt. Chemistry **21**, 991 (1949).

Zur Mikrobestimmung der Jodzahl.

Von

Walther Ruziczka, Wien.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

Die große Bedeutung, die der Bestimmung der Jodzahl vor allem in der Fettanalyse zukommt, hat es mit sich gebracht, daß verhältnismäßig bald versucht wurde, auch auf diesem Gebiete Mikromethoden anzuwenden. So hat *E. Chargaff*[1] eine Mikrobestimmung der Jodzahl nach *Hanuš* geschaffen, wobei Einwaagen von 0,01 bis 0,02 g angewendet werden und mit 0,05-n-Natriumthiosulfatlösung titriert wird. *R. Witol*[2] verwendet für eine Mikrobestimmung nach *Hübl* Stammlösungen in Chloroform.

Eine einzigartige Stellung unter den Jodzahlbestimmungsmethoden nimmt die sog. Jodzahlschnellmethode von *B. M. Margosches, W. Hinner* und *L. Friedmann*[3] ein, wobei das Wort „Schnellmethode" nicht bedeutet, daß dieses Verfahren etwa ungenauer ist als andere Methoden. Sie beruht auf der Hydrolyse von Jod durch Wasser nach der Gleichung $J_2 + H_2O \rightleftarrows JOH + HJ$ und hat den Vorteil, daß eine einheitliche Versuchsdauer von 5 Minuten angewendet werden kann, wobei die emulgierte Substanz rascher reagiert als in echter Lösung. Da bei dieser Methode vor allem Alkohol und Aceton als Lösungsmittel angewendet werden, eignet sie sich besonders für die Untersuchung physiologischer Flüssigkeiten, doch konnte ich anderseits zeigen[4], daß durch Zwischenschaltung einer Ätherphase auf diesem Wege auch besonders schwer lösliche Substanzen, wie Öllacke und Lackemaille, mit Leichtigkeit bestimmt werden können. In der chemischen Praxis wird, wie sich der Verfasser selbst überzeugen konnte, der Modifikation von *Ernst Galle* (Anwendung von Äther-Aceton als Lösungsmittel) insbesondere bei niedrigen Jodzahlen oft der Vorzug gegeben, weil in diesem Falle geringere Jodausscheidungen eintreten und sich dadurch der nachträgliche Zusatz von Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff erübrigt.

Bereits 1926 haben *B. M. Margosches* und *E. Neufeld*[5] eine sog. Halbmikroschnellmethode unter Anwendung von 50 mg Einwaage ge-

schaffen. Im Jahre 1935 ging ich einen Schritt weiter[6] und arbeitete im Institut für medizinische Chemie der Universität Graz auf dieser Grundlage eine echte Mikrobestimmung aus.

Die einzuwägende Substanz wird in ein zylinderförmiges Röhrchen von 1 cm Durchmesser und 1,5 cm Höhe gebracht und dieses zu etwa zwei Drittel gefüllt. Ferner werden zylindrische Kapillaren von etwa 3,2 cm Länge und 1 bis 1,5 mm Dicke angewendet, die Einwaagen durch Eintauchen bewerkstelligt und samt den Kapillaren in 50-ml-Glasstöpselflaschen geworfen. Bei Rizinusöl und festen Fetten können die durchschnittlichen Einwaagen von 5 bis 10 mg noch überschritten werden. Gelöst wird in 1 ml Alkohol, Aceton, Äther-Aceton, Amylalkohol + abs. Alkohol. Bei schwerlöslichen Substanzen, wie Lacken und Lackemaillen, wird nach neueren Erfahrungen zunächst in 0,4 ml Schwefeläther gelöst, wobei durch den folgenden Alkoholzusatz bereits eine teilweise Emulgierung erfolgen kann. Nur beim Lösen von unverseiften Fetten in absolutem Alkohol ist schwaches Erwärmen am Wasserbad und kurzes Abkühlenlassen notwendig.

Hierauf werden 2 ml n 5 alkoholische Jodlösung und 20 ml dest. Wasser zugesetzt und nach 5 Min. Stehenlassen wird mit n/20-Natriumthiosulfatlösung aus einer 10-ml-Mikrobürette, die eine Schätzung von 0,002 ml zuläßt, zurücktitriert. Da 50% Jod als Jodwasserstoffsäure abgespalten werden, kann zur Kontrolle eine jodometrische Säurebestimmung folgen, was nach Zusatz von 1 ml 3%iger Kaliumjodatlösung möglich ist.

Vortragender hat nach dieser Methode bei Ölsäure, Olivenöl, Sesamöl, Mohnöl, Vigantol-Lebertran, Leinöl, Rizinusöl, Butter, Margarine und Schweineschmalz mit der Makromethode sehr gut übereinstimmende Werte erhalten. Sie wurde in das Handbuch für Untersuchung der Lebensmittel aufgenommen.

Vor wenigen Jahren hat *G. Gorbach*[7] anläßlich der Mikrobearbeitung aller fettanalytischen Konstanten auch die sehr bewährte und von der internationalen Fettanalysenkommission empfohlene Jodzahlbestimmungsmethode von *H. P. Kaufmann*[8] in die Mikroanalyse eingeführt. Es wird demnach Brom in Natriumbromid enthaltendem Methylalkohol angewendet. Mit Glasösen werden je nach der Höhe der Jodzahl 1 bis 4 mg eingewogen, die Versuchsdauer beträgt 10 bis 60 Minuten.

Zusammenfassung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der gehaltene Vortrag von den bisher vorliegenden Mikrojodzahlbestimmungsmethoden die Mikroversion der Jodzahlschnellmethode nach *Margosches* und Mitarbeitern besonders hervorgehoben hat, die der Verfasser im Jahre 1935 im Institut für medizinische Chemie der Universität Graz auszu-

arbeiten Gelegenheit hatte. Sie zeichnet sich durch vereinheitlichte Einwaage, kurze und einheitliche Versuchsdauer und allgemeine Anwendbarkeit besonders aus, ist einfach durchzuführen und gibt verläßliche Resultate. Abschließend wurde auf die 1944 von *Gorbach* ausgearbeitete Mikrojodzahlbestimmung nach *Kaufmann* hingewiesen und empfohlen, die *Gorbach*sche Mikrobürette auch zur Verfeinerung der Mikrojodzahlschnellmethode heranzuziehen.

Summary.

Among the previous methods for the determination of the iodine number the one developed by the author in 1935 for the micro version of the rapid iodine number method, was particularly described by *Margosches* and his collaborators. It is especially distinguished by a uniform sample, short and uniform time of procedure, and general applicability. It is simple to carry out and yields reliable results. Reference is also made to the micro-iodine number determination after *Kaufmann* worked out in 1944 by *Gorbach*, and the use of the *Gorbach* microburette is recommended for refining the micro iodine number rapid method.

Résumé.

Parmi les méthodes existant jusqu'ici pour la détermination de l'indice d'iode, celle de l'auteur, décrite en 1935 est une micro-version de la méthode rapide de *Margosches* et coll. Elle se caractérise particulièrement par une pesées standard, par une durée d'expérience courte et unifiée, une utilisation générale. Elle est facilement exécutable et donne des résultats acceptables. La méthode de *Gorbach* 1944, adaptée d'après *Kaufmann* à la microdétermination de l'indice d'iode est également démonstrative et l'on recommande l'emploi de la microburette de *Gorbach* pour affiner la microméthode rapide.

Diskussion.

H. *A. Préobrajenski* (Paris): Wie lange kann eine Mikro-Jodzahlbestimmung in Öl dauern? Wird ein Katalysator angewandt?

H. *W. Ruziczka*: Die Reaktionsdauer beträgt einheitlich 5 Minuten und wurde insbesondere bei der Makromethode, mit der die Mikromethode gut übereinstimmt, in sehr zahlreichen Fällen überprüft. Die Dauer der ganzen Operation hängt von der Übung des Ausführenden ab. Es wird kein spezieller Katalysator angewandt. Im weiteren Sinne wirkt das hydrolysierende Wasser katalytisch.

Literatur.

[1] *E. Chargaff*, Z. physiol. Chem. **199**, 222 (1931).

[2] *R. Witol*, Öl- u. Fett-Ind., Maslobojno-shirowoje djelo, **10**, Nr. 7, 37 (1934).

[3] *B. M. Margosches*, *W. Hinner* und *L. Friedmann*, Die chemische Analyse, Bd. 25, Verlag F. Enke Stuttgart, 1927.

[4] *W. Ruzicka*, Farben-Chemiker **5**, 85 (1934).

[5] *B. M. Margosches* und *E. Neufeld*, Chem.-Ztg. **50**, 210 (1926).

[6] *W. Ruzicka*, Mikrochem. **17**, 215 (1935).

[7] *G. Gorbach*, Mikrochem. **31**, 320 (1944).

[8] *H. P. Kaufmann*, Fette u. Seifen **47**, 499 (1940).

Aus dem Institut für biochemische Technologie und Lebensmittelchemie der Technischen Hochschule Graz.

Mikrochemie in der Gewässerforschung.

Von

Karl Stundl.

(Eingelangt am 22. Juni 1950.)

Die verschiedenen Oberflächenwässer, Seen, Teiche, Flüsse und Bäche enthalten ebenso wie die unterirdischen Wasservorkommen in wechselnder, meist aber sehr geringer Menge gelöste Elektrolyte, welche als Nährstoffe oder auch als Milieufaktoren, wie die Carbonate, Sulfate und Chloride, von großer Bedeutung für das Organismenleben der Gewässer sind.

Für den Biologen ist die Bestimmung dieser Beimengungen sehr wichtig, da sie ihm die Erklärung für die verschiedenartige Zusammensetzung der tierischen und pflanzlichen Lebensgemeinschaften und ihres jahreszeitlichen Wechsels geben. Wesentlich ist dabei, daß die Methoden so beschaffen sind, daß sie nach einiger Schulung auch von jedem, der nicht Fachchemiker ist, wie das bei Biologen meist der Fall ist, ausgeführt werden können, ausreichend genaue Resultate geben und keine umfangreiche Laboratoriumseinrichtung benötigen. Dafür sind naturgemäß Mikromethoden am besten geeignet, da sie kleinste Mengen in kleinen Probenvolumen zu erfassen gestatten. Während für die Bestimmung der wichtigsten Ionen im Wasser vor noch nicht allzulanger Zeit in den Lehr- und Handbüchern der Wasseruntersuchung eine Probenmenge von insgesamt mindestens 2 Liter Wasser je Entnahmestelle als nötig erachtet wurde, erlauben die mikrochemischen Verfahren eine weitgehende Verringerung dieses Quantums, und es genügen 250 bis 300 ml vollauf, um eine Analyse aller für die Charakterisierung einer Wasserprobe nötigen Bestimmungen durchzuführen.

Die von *Gorbach* und Mitarbeitern[1] und vielen anderen entwickelten Verfahren ermöglichen Bestimmungen bereits in Probemengen von 5 bis 10 ml mit ausreichender Genauigkeit auszuführen, wobei besonders die Mikrobürette nach *Gorbach* vorteilhaft angewendet werden kann.

Welchen Vorteil die so weitgehend verringerte Probenmenge darstellt, wird jeder ermessen können, der an entlegenen Orten Probeentnahmen durchzuführen und diese in anstrengendem Fußmarsch zur nächsten Bahn- oder Kraftwagenstation zu bringen hatte.

Wo aber Untersuchungen weitab von jeder Verbindung zum Laboratorium durchgeführt werden müssen, etwa bei ausgedehnten Bearbeitungen hochgelegener Bergseen, oder aber während des Transportes Veränderungen der Proben eintreten können, wie etwa bei Abwasser, sind die Feldmethoden[2, 3] besonders beliebt, die eine Untersuchung an Ort und Stelle auszuführen oder wenigstens einzuleiten gestatten. Sowohl die Bestimmung der gelösten Gase, des Sauerstoffes nach *Winkler*[4], des Kohlendioxyds durch Titration mit Natriumcarbonat[5] und des Schwefelwasserstoffes durch kolorimetrischen Farbvergleich sowie der wichtigsten Stickstoffverbindungen lassen sich mit derartigen Feldmethoden mit ausreichender Genauigkeit in kleinen Flüssigkeitsmengen durchführen. Wenn auch die angewandten Methoden vielleicht, wie etwa bei den kolorimetrischen Arbeitsweisen, gegenüber dem Laboratoriumsverfahren eine vergrößerte Fehlerbreite aufweisen, so wird dies völlig ausgeglichen, wenn man an die Veränderungen denkt, die etwa eine Abwasserprobe bei längerem Transport erleiden kann. So nahm z. B. in einer Probe häuslichen Abwassers der Ammoniumgehalt in 24 Stunden von 7,92 mg/l bei Entnahme auf 19,20 mg/l, also in der Stunde um fast 0,5 mg/l zu. Der Nitritgehalt eines Brauereiabwassers erhöhte sich im gleichen Zeitraum von 4,69 auf 16,50 mg/l, also ebenfalls um etwa je 0,5 mg/l je Stunde. Auch Gehaltsabnahmen in ähnlichem Ausmaß kommen vor. Man bekäme demnach nach längerem Transport zum Laboratorium bei der Untersuchung Werte, die von jenen zur Zeit der Entnahme völlig verschieden wären und ein falsches Bild geben könnten. Ammonium, Nitrit und Phosphat wird bei diesen Arbeitsweisen durch Farbvergleich mit genau gestellten Standardlösungen in hoher Schicht unter Änderung der Schichthöhe in Hehnerzylindern verglichen.[6] Diese Bestimmung hat gegenüber der in dem bekannten Helligekomperator den Vorteil der weitaus größeren Genauigkeit. Wenn es gelingt, die immerhin mit dem Fehler der subjektiven Beurteilung des Farbgrades bzw. Farbgleichheit behafteten kolorimetrischen Methoden, deren Fehlerbreite nach unseren Erfahrungen nur etwa 2% des Absolutwertes beträgt, durch maßanalytische Verfahren zu ersetzen, ist das erstrebte Ziel jeder Feldmethode erreicht. Der Vorteil der Mikroverfahren ist ja die Bestimmung in kleinsten Flüssigkeitsmengen, wodurch die Menge der mitzuführenden Titrierlösungen weitgehend verringert werden kann. Eine solche Methode ist z. B. die jodometrische Sulfatbestimmung nach *Steffan*.

Der Gewässerforschung haben diese Verfahren jedenfalls einen bedeutenden Auftrieb gegeben, da es erst durch sie dem chemisch etwas

vorgebildeten und in diese Bestimmung eingearbeiteten Biologen möglich wurde, rasch und mit weitgehender Genauigkeit die Untersuchung der chemischen Zusammensetzung der verschiedenen Gewässer vorzunehmen und das Milieu zu erforschen, in dem sich die von ihm beobachteten Lebensvorgänge abspielen.

Eine lediglich chemische Untersuchung der Gewässer wäre aber zu wenig, da erst im Zusammenhang mit dem biologischen Befund die Unterschiede des Ionengehaltes und besonders die Schwankungen der Stickstoff- und Phosphormengen verständlich werden. Auch bei Analysen des Grundwassers stellen die biologischen Befunde, wie etwa die Ermittlung von Zahl und Art der vorhandenen Bakterien oder die Prüfung auf das Vorhandensein anderer, z. B. tierischer Kleinlebewesen, eine wichtige Ergänzung der chemischen Ergebnisse dar. Oft kann erst die biologische Analyse einen zunächst unverständlichen chemischen Befund aufklären. So wird das Verschwinden von Stickstoff- und Phosphorverbindungen, welche von Mikroorganismen als Nährstoffe verbraucht werden, oder des Sulfats, das durch Bakterien reduziert wird, erst durch die entsprechenden biologischen Befunde erklärlich. Die mikrochemischen Verfahren ermöglichen weiterhin die Untersuchung der Zusammensetzung kleinster Wasserorganismen, der Nährwert dieser Klein- und Kleinstlebewesen kann festgestellt werden und ergibt dann in großen Zügen die Produktionsbilanz eines Gewässers.[8] Auf einem kleinen Filterblättchen werden die in 1 Liter Wasser vorhandenen Planktonorganismen gesammelt und auf der Mikrowaage das Gewicht ihrer Trockensubstanz bestimmt. Bei der Untersuchung von über 100 Teichen wurden Werte von 0,12 bis 140 mg/l gefunden, was auf ein Hektar umgerechnet im letzteren Falle die respektable Menge von fast 1,5 t trockener Planktonmasse ergibt. Die entsprechenden Stickstoffwerte dieser Planktonmengen liegen zwischen 0,03 und 1,43 mg für das in 1 Liter vorhandene Plankton, die dazugehörigen Phosphatgehalte bewegen sich zwischen 0,0005 und 0,035 mg.[9] Da durch mikroskopische Zählung die vorhandenen Organismen zahlen- und artmäßig bestimmbar sind, läßt sich, was nur als Kuriosum erwähnt sei, der Nährwert einzelner Planktonorganismen annähernd berechnen.

Die moderne Gewässerforschung begnügt sich aber nicht allein damit, die chemischen Vorgänge im Wasser, den Kreislauf der Nährstoffe, Rhythmus und Ausmaß der Planktonbildung zu erfassen, sondern bemüht sich auch, die so überaus wichtigen bakteriellen Umsetzungsvorgänge im Wasser und im Schlamm zu erklären.

Von besonderer wirtschaftlicher Bedeutung scheinen die Untersuchungen, welche die Möglichkeit der Steigerung der Fischproduktion betreffen. Dabei wurde getrachtet, den Wert der einzelnen Planktonassoziationen für die Fischernährung festzustellen.

Die von *G. Gorbach* und Mitarbeitern ausgearbeiteten mikrochemischen Schnellverfahren zur Fett-[10] und Eiweißbestimmung[11] gestatten bei Verwendung kleinster Materialmengen die Nährwertbestimmung des Planktons und die Prüfung der Umsetzung der aufgenommenen Nahrung im Fischkörper.

Mikrochemische und spektralanalytische Verfahren geben eine Möglichkeit zu verfolgen, ob und in welchem Ausmaß die in der Nahrung aufgenommenen Substanzen im Fleisch des Fisches abgelagert werden und wie sie möglicherweise das Wachstum und außerdem die Zusammensetzung des Fleisches beeinflussen.

Gegenwärtig laufen Untersuchungen über die Veränderungen, welche das Fleisch von Teichkarpfen durch Fütterung mit verschiedenen Futtermitteln erfährt. Diese Feststellungen sind deshalb wirtschaftlich bedeutungsvoll, da die Qualität des Fischfleisches begreiflicherweise den Absatz beeinflußt und weiterhin diese Untersuchungen auch Hinweise für die rationellste Fütterung geben können.

Die mikrochemischen Verfahren gestatten auch hier wieder eine große Zahl von Bestimmungen nebeneinander auszuführen und zahlreiche Vergleichswerte in kurzer Zeit zu bekommen. Diese wenigen Hinweise aus diesem Anwendungsgebiet der Mikrochemie zeigen aber das Ausmaß der sich ergebenden Möglichkeiten. Der besondere Vorteil der Anwendung von Mikroverfahren liegt dabei darin, daß sie dem Biologen ermöglichen, ein ausreichendes Analysenmaterial mit einfachen und vor allem billigen Mitteln zu gewinnen und ihm gestatten, seine Beobachtungen auch an entlegenen Orten auszuführen.

Zusammenfassung.

Zur Feststellung der in den verschiedenen Gewässern vorhandenen Elektrolyte, deren Menge meist nur wenige Milligramm bis einige Mikrogramm je Liter beträgt, braucht der mit diesen Untersuchungen befaßte Biologe Methoden, die ihm bei einfacher Handhabung hinreichend genaue Ergebnisse liefern und dabei möglichst eine Untersuchung schon am Entnahmeort zulassen. Mikroverfahren und Feldmethoden entsprechen diesen Anforderungen, sie erlauben die Bestimmung der wichtigsten Ionen in kleinsten Volumen rasch und mit ausreichender Genauigkeit vorzunehmen, die verwendeten Geräte sind leicht transportabel.

Auch für wirtschaftliche Fragen haben diese Verfahren Bedeutung, da durch sie die verfügbare Nahrungsmenge in einem Gewässer (Plankton) und die Verwertung desselben durch den Fisch, ebenso aber auch die aus künstlichen Futtermitteln aufgenommenen Anteile untersucht werden können. Die mikrochemischen Verfahren liefern hier schnell eine große Anzahl von Vergleichswerten.

Summary.

The determination of the electrolytes present in waters, whose content usually runs from only a few milligrams to several gamma per liter, requires that the biologist, who is making such studies, have available to him methods which, by a simple procedure, yield results of sufficient accuracy, and which, so far as possible, permit the examination to the carried out at the spot where the sample is taken. Micro-procedures and field methods meet these demands; they permit the determination of the most important ions in very small volumes rapidly and with adequate accuracy; the necessary apparatus is readily carried about.

These procedures are also of importance to economic questions, since they yield information about the available nutriments in a body of water (plankton) and its utilization by the fish, and also concerning the part taken in from artificial foods. The microchemical procedure quickly yields a large number of comparative values in such cases.

Résumé.

Pour connaître les électrolytes contenus dans les eaux variées dont la teneur est le plus souvent de l'ordre de quelques mg jusqu'à quelques γ par litre, on utilise des méthodes qui intéressent le biologiste et qui lui donnent des résultats suffisamment précis par une manipulation simple, et, par suite, rendent possible l'investigation à l'endroit même du prélèvement. Les micro-procédés et les méthodes sur le terrain correspondent à ces désirs; ils permettent d'entreprendre le dosage des ions les plus importants dans les moindres volumes, rapidement et avec une précision suffisante; les dispositifs utilisés sont facilement transportables. De même, pour des problèmes économiques, ces procédés ont de l'intérêt car ils peuvent permettre de connaître la quantité de matière alimentaire disponible dans une eau (plancton) et la valeur de celle-ci pour le poisson, de même que des portions prélevées sur des fourrages artificiels. Les procédés microchimiques conduisent ici rapidement de collationner un grand nombre de données.

Diskussion.

H. *S. Foghammar* (Boras, Schweden) erwähnt die Möglichkeit, rasche Veränderungen des Abwassers nach der Probenahme durch Transport in eisgekühlten Kupferbehältern zu vermeiden, und betont, daß für die bakteriologische Untersuchung ohnehin eine größere Menge Wasser mitgenommen werden muß, z. B. um zu genauen Coli-Zahlen zu gelangen. In einem Kleinauto, mit dem man auch zu hochgelegenen Gewässern im Gebirge gelangen kann, lassen sich leicht ein Dutzend Proben mitnehmen, die gekühlt transportiert im Laboratorium sogleich von mehreren Mitarbeitern untersucht werden können. Es reicht also die Makroanalyse durchaus hin.

H. *K. Strudl*: Auch in eisgekühlten Proben verändert sich, besonders bei Abwässern, die chemische Zusammensetzung durch fermentativen Abbau, wenn auch verlangsamt. Für bakteriologische Untersuchungen ist die Mitnahme von Proben erforderlich, aber dann eben nur für diese und daher in geringerer Menge. Der Vorteil der Feldmethoden liegt in der Möglichkeit, am Entnahmeort eine Orientierung über die Wasserverhältnisse zu bekommen und danach die Auswahl der nötigen chemischen und bakteriologischen Proben zu treffen. Diese Orientierung erst im Laboratorium zu erhalten, führt entweder zur Unvollständigkeit der Untersuchung oder dazu, daß eine

neuerliche Fahrt zur Entnahmestelle nötig werden kann. Gewiß können mit dem Kleinauto auch hochgelegene Gewässer erreicht werden, doch verfügen in Österreich nur wenige Institute über Kraftwagen und es ist leichter, den Fachmann für die Untersuchung an Ort und Stelle zu finden, als ein Auto zu erwerben.

H. *R. Werner* (Düsseldorf, Deutschland) regt die Einführung eines Feldbesteckes zur hygienischen Wasseruntersuchung an. Auch Mineralwasserapparate müssen an Ort und Stelle auf Cu, Pb und Zn geprüft werden.

H. *K. Stundl*: Mikrochemische Feldmethoden gestatten die Bestimmung der besonders für die hygienische Beurteilung wichtigen Stickstoffverbindungen (NH_4^+, NO_2^- und NO_3^-) sowie von Fe, Chlorid, Sulfat und Carbonat am Entnahmeort. Auch die Prüfung auf Cu, Pb und Zn läßt sich mikrochemisch unmittelbar an der Entnahmestelle durchführen, worüber in Kürze berichtet werden soll.

Literatur.

[1] *G. Gorbach*, Monatsh. Chem. **77**, 97 (1947).

[2] *R. Czensny*, Untersuchungsverfahren zur chemischen Wasseranalyse, Stuttgart. 1943.

[3] *H. Müller*, Int. Rev. ges. Hydrobiol. Hydrogr. **28**, 351 (1933).

[4] *L. Winkler*, Z. Unters. Lebensmittel **47**, 257 (1924).

[5] *R. Maucha*, Hydrochemische Methoden in der Limnologie, Bd. XII aus „Die Binnengewässer", 1932.

[6] *K. Stundl*, Schweiz. Z. Hydrologie **11**, 519 (1949).

[7] *G. Gorbach* und *G. Steffan*, Mikrochemische Trinkwasseranalyse (unveröffentlicht).

[8] *W. Einsele*, Z. Fischerei u. Hilfswissensch. **39**, 407 (1941).

[9] *K. Stundl*, Österreichs Fischerei **1**, 32 (1948).

[10] *G. Gorbach*, Vorratspflege und Lebensmittelforschung **3** (1940).

[11] *F. Pregl*, Quantitative organische Mikroanalyse, 6. Auflage, neubearbeitet von Dr. *H. Roth*, Springer-Verlag Wien. 1949.

Istituto di Chimica Farmaceutica dell'Università di Modena.

La determinazione degli acidi chinurenico e xanturenico.

Di

Luigi Musajo e Dino Coppini.

(Trasmesso 2 agosto 1950.)

Questa comunicazione che riguarda la determinazione di piccole quantità di acido chinurenico e di acido xanturenico, i due acidi a nucleo chinolinico che si formano dal triptofano nel ricambio animale, non rappresenta che un aspetto analitico del grande problema di ordine biologico e chimico-biologico delle trasformazioni che subisce il triptofano „in vivo": si formano così i due composti chinolinici sopra ricordati dei quali l'acido chinurenico o acido 4-ossichinolin-2-carbonico, fu scoperto nel 1853 da *Liebig*, la costituzione chiarita nel 1921 da *Späth*[1], l'acido xanturenico o acido 4-8-diossichinolin-2-carbonico scoperto da uno di noi[2] e studiato a partire dal 1934.

Il triptofano si trasforma dapprima, come ha messo in evidenza *Butenandt*, in α-ossitriptofano (sostanza scoperta da *Wieland*), successivamente si passa alla chinurenina (sostanza scoperta nel 1925 da *Ellinger* e *Matsuoka* e studiata dalla scuola giapponese di *Kotake* a partire dal 1931), la cui costituzione è stata definitivamente chiarita nel 1940 da *Butenandt*[3].

Il nuovo termine di passaggio sarebbe l'acido o-aminobenzoilpiruvico, ma nello scorso anno *Musajo, Spada* e *Bulgarelli*[4] hanno dimostrato che questa sostanza non si isola, perchè si chiude immediatamente a derivato chinolinico, cioè ad acido chinurenico.

Questo fatto messo in relazione con quanto dimostrarono *Musajo* e *Chiancone*[5] nel 1937 cioè che l'acido xanturenico si forma „in vivo" dal triptofano attraverso la chinurenina, ha portato a prevedere l'esistenza della 3-ossichinurenina fra i prodotti del ricambio intermedio del triptofano.

La sintesi di questa sostanza fu realizzata da *Musajo, Spada* e *Casini*[6] nel laboratorio di Modena alla fine del 1949 e comunicata nel

gennaio 1950, ma quando la ricerca era finita e con successo, si venne a conoscenza di una notizia comunicata da *Butenandt* e coll.[7] con la quale veniva annunziata la sintesi di questa sostanza in maniera leggermente diversa. La 3-ossichinurenina appare di speciale importanza biologica, poichè sembra intervenga (*Butenandt* l. c.) nella formazione del pigmento degli occhi degli insetti e che da essa derivi biologicamente, attraverso l'acido 3-ossiantranilico, l'acido nicotinico.

Recentemente *Musajo, Chiancone* e *Coppini*[8] hanno pure dimostrato con prove sugli animali, che essa è la sostanza madre dell'acido xanturenico; infatti somministrata ai ratti questi eliminano con le urine fino al 28% sul suo peso di acido xanturenico.

Da tutti questi dati risulta chiara la importanza di disporre di metodi analitici sensibili per la determinazione dei derivate del triptofano per poter condurre ricerche in questo importante campo di studio.

Bisognerebbe avere la possibilità di determinare la chinurenina e la ossichinurenina da una parte e l'acido xanturenico e chinurenico dall'altra. Per le prime due sostanze, chinurenina e 3-ossichinurenina, riteniamo che il problema sia da esaminare nuovamente.

Per quanto riguarda l'acido chinurenico dobbiamo ricordare i vecchi metodi fondati sulla defecazione con reattivi vari, concentrazione del filtrato, acidificazione e pesata dell'acido chinurenico che si separa.

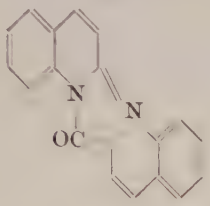
Questi metodi non presentano sicurezza, non sono applicabili a piccolo quantità di sostanza e la necessità di disporre di uno procedimento migliore viene nettamente indicata dai ricercatori che si sono occupati dell'argomento anche in tempi abbastanza recenti, esempio *Jackson* che nel 1939[9] studiò l'eliminazione dell'acido chinurenico in differenti famiglie di carnivori ospiti del Giardino Zoologico di New York. Inoltre il procedimento per pesata può condurre a pesare insieme acido chinurenico e acido xanturenico, se quest'ultimo è presente come spesso accade. Questa circostanza a noi nota non è stata considerata dai ricercatori che si sono occupati dell'acido chinurenico; ne consegue che molti dati riguardanti tale acido andranno riesaminati da questo punto di vista.

Noi da quattro anni ci siamo occupati per trovare un metodo analitico per la determinazione degli acidi chinurenico e xanturenico e riferiamo sul metodo al quale siamo pervenuti e che ci ha permesso di dosare separatamente quantità dell'ordine di 200 γ rispettivamente dei due acidi.

La determinazione dell'acido xanturenico è fondata sulla colorazione verde che questa sostanza dà in ambiente leggermente alcalino con i sali ferrosi.

La determinazione dell'acido chinurenico è fondata sulla sua trasformazione in una sostanza colorante rossa del tipo di quelle che

ottenne per la prima volta nel 1894 *Besthorn*[10] dall'acido chinaldinico e che possono riferirsi anche secondo ricerche recenti[11] alla formula:



Ma queste sostanze presentano il grave inconveniente di essere estremamente sensibili alla luce. Noi siamo riusciti a prepararne una dall'acido chinurenico, la cui costituzione non è ancora chiarita, le cui soluzioni sono stabili e non presentano inconvenienti nella misura.

L'acido chinurenico non produce alcuna colorazione con i sali ferrosi e con i sali ferrici, perciò la sua presenza non influisce sulla determinazione dell'acido xanturenico.

L'acido xanturenico può invece interferire nella formazione della sostanza colorante rossa, ma noi abbiamo potuto risolvere anche questa difficoltà ricorrendo ad una cauta e breve ossidazione con permanganato potassico, il quale distrugge immediatamente l'acido xanturenico, mentre l'acido chinurenico viene attaccato solo dopo tempo.

Concludiamo riferendo il metodo: Una soluzione contenente almeno 200 γ di ciascuno dei due acidi, viene acidificata a p_H 1,5—2 e ripetutamente estratta con alcole iso-amilico; l'estratto amilico viene a sua volta agitato con soluzione di bicarbonato sodico all' 1%. Gli acidi passano così nella soluzione acquosa, la quale viene portata a volume (ml 20).

Una parte aliquota di questa soluzione (ml 8) trasportata in altro palloncino viene addizionata di piccola quantità di sale di *Mohr;* si ottiene colorazione verde e la misura viene condotta con i metodi noti.

Un'altra porzione (ml 10) della soluzione acquosa viene alcalinizzata con idrato sodico e trattata con permanganato potassico (ml 5) per 5 minuti, trascorsi i quali si interrompe l'ossidazione con piccola quantità di bisolfito sodico; dopo centrifugazione del biossido di manganese, la soluzione acidificata a p_H 2 viene ancora estratta con alcole amilico. In questa nuova soluzione amilica si ritrova solo l'acido chinurenico.

L'alcole amilico viene evaporato nel vuoto ed il residuo contenuto nel palloncino viene seccato in stufa per breve tempo. Successivamente si aggiungono mg 50 di pentacloruro di fosforo, ml 1 di ossicloruro di fosforo, si innesta una allunga smerigliata e si fa bollire a ricadere su una microfiamma per 15 minuti. Dopo raffreddamento si aggiungono

ancora ml 0,1 di chinolina purissima, e quindi dopo raffreddamento con grande precauzione sotto cappa, alcole etilico di 95° goccia a goccia.

Abbiamo notato che la distillazione nel vuoto dell'eccesso di ossicloruro di fosforo può condurre a delle perdite, che non si hanno aggiungendo l'alcole etilico lentamente.

La soluzione alcolica è di un bel colore rosso-viola (massimo di assorbimento 556—557 m μ, spettrofotometro *Beckmann*, mod. D. U.) e notevolmente stabile, tanto che la lettura fotometrica può essere condotta senza difficoltà.

Entrambe le soluzioni colorate seguono per lo meno nei limiti sperimentali (0,2—5 mg) la legge di *Beer*.

Abbiamo applicato questo procedimento, sia a miscugli solidi di acidi chinurenico e xanturenico, sia a soluzioni di questi, sia ad urine di animali in esperimento.

Questo metodo presenta una certa laboriosità ma i risultati sono buoni e riteniamo che esso rappresenti un mezzo di ricerca di una certa importanza quando, come oggi avviene, si presenta la necessità di sperimentare sulle trasformazioni biologiche del triptofano.

Riassunto.

Gli AA. sono riusciti a passare dall'acido chinurenico ad una sostanza del tipo dei coloranti chinolinici di *Besthorn*, ma più stabile alla luce. Gli AA. hanno ottenuto, clorurando l'acido chinurenico con pentacloruro ed ossicloruro di fosforo e per azione successiva della chinolina sul prodotto della reazione, una sostanza colorante la cui soluzione in alcole etilico è di un bel colore rosso viola ed è notevolmente stabile alla luce.

L'acido xanturenico viene determinato attraverso la colorazione verde che si ottiene aggiungendo alla sua soluzione in bicarbonato sodico all'1%, piccole quantità di sale ferroso.

L'acido xanturenico può essere determinato in presenza di acido chinurenico, viceversa nella determinazione di quest'ultimo per evitare interferenze si procede ad una cauta e breve ossidazione con permanganato potassico, che distrugge solo l'acido xanturenico. L'acido chinurenico viene, dopo acidificazione, estratto con alcole isoamilico e trasformato nella sostanza colorante rossa. Dalle urine i due acidi vengono ugualmente estratti con alcole isoamilico.

Il metodo dà risultati ancora netti quando nel campione che si analizza sono contenuti 200 γ rispettivamente di ciascuno dei due acidi ossichinolincarbonici.

Zusammenfassung.

Die Herstellung eines lichtbeständigen Chinolinfarbstoffes von der Art der *Besthorn*schen Produkte aus Kynurensäure wurde erforscht. Durch

Chlorierung dieser Säure mit Phosphorpentachlorid und -oxychlorid und durch nachfolgende Umsetzung des Reaktionsproduktes mit Chinolin wurde eine Substanz erhalten, deren äthylalkoholische Lösung schöne rotviolette Färbung und Lichtbeständigkeit zeigt.

Xanthurensäure kann mit Hilfe der Grünfärbung bestimmt werden, die durch Zusatz geringer Mengen Eisen-(II)-salz zu einer Lösung dieser Säure in 1%igem Natriumbicarbonat erhalten wird.

In Gegenwart von Kynurensäure kann Xanthurensäure bestimmt werden; aber man muß, um erstere störungsfrei zu bestimmen, kurz und vorsichtig mit Permanganat oxydieren, wobei nur Xanthurensäure zerstört wird. Die Kynurensäure wird sodann nach Ansäuern mittels Isoamylalkohol extrahiert und durch Überführung in den roten Farbstoff bestimmt. Aus Harn sind beide Säuren gleicherweise mit Isoamylalkohol extrahierbar.

Die Methode gibt befriedigende Resultate, wenn die Analysenprobe 200 γ von jeder der beiden Oxychinolincarbonsäuren enthält.

Summary.

A study was made of the preparation of a light-resistant quinoline dye of the type of the *Besthorn* product, from kynurenic acid. By chlorinating this acid with phosphorus pentachloride and oxychloride and subsequent treatment of the reaction product with quinoline, a material was obtained, whose beautiful red-violet ethanol solution is light-stable. Xanthurenic acid can be determined with the aid of the green color, which develops when small quantities of a ferric salt are added to a solution of this acid in 1% sodium bicarbonate.

Xanthurenic acid can be determined in the presence of kynurenic acid but in order to avoid interference in the determination of the latter it is necessary to carry out a brief and cautious oxidation with permanganate, whereby only the xanthurenic acid is destroyed. The kynurenic acid is then extracted from the acidified solution by means of iso-amylalcohol and determined by conversion into the red dyestuff. Both acids may be extracted in like manner from urine by means of iso-amylalcohol. The method yields satisfactory results, if the sample taken for analysis contains 200 γ of each of the two oxyquinoline carboxylic acids.

Résumé.

La préparation, à partir d'acide cynurénique, d'un colorant quinoléique, stable à la lumière, de même nature que les produits de *Besthorn*, a été mise en oeuvre. Par chloruration de cet acide à l'aide du penta et de l'oxychlorure de phosphore et action subséquente du produit de la réaction sur la quinoléine, on a obtenu une substance dont la solution alcoolique présente une belle teinte violet-rouge et une stabilité à la lumière. L'acide xanthurénique peut être dosé au moyen de la coloration verte qui est obtenue par addition d'une faible quantité de sel ferreux à cet acide, en solution dans le bicarbonate de sodium à 1%.

L'acide xanthurénique peut être dosé en présence d'acide cynurénique, mais on doit oxyder par le permanganate rapidement et avec prudence pour faire le dosage sans interférence, de sorte que l'acide xanthurénique seulement soit détruit. L'acide cynurénique est alors extrait avec l'alcool isoamylique après acidification et dosé par transformation en colorant rouge. A partir de l'urine, les deux acides sont extractibles de la même manière par l'alcool isoamylique. La méthode donne des résultats satisfaisants quand la prise d'essai contient 200 γ de chacun des deux acides hydroxy-quinoléine-carboxyliques.

Bibliografia.

[1] *E. Späth*, Monatsh. Chem. **42**, 93 (1921).
[2] *L. Musajo*, Gazz. chim. ital. **67**, 166 (1937); *L. Musajo* e *Margherita Minchilli*, Ber. dtsch. chem. Ges. **74**, 1839 (1941).
[3] *A. Butenandt*, Z. angew. Chem. **54**, 89 (1941).
[4] *L. Musajo*, *A. Spada* e *E. Bulgarelli*, Gazz. chim. ital. **80**, 161 (1950).
[5] *L. Musajo* e *F. M. Chiancone*, Gazz. chim. ital. **67**, 218 (1937).
[6] *L. Musajo*, *A. Spada* e *E. Casini*, Gazz. chim. ital. **80**, 171 (1950).
[7] *A. Butenandt*, *W. Weidel* und *Schloßberger*, Z. Naturforschung **4**-b, 242 (1949).
[8] *L. Musajo*, *F. M. Chiancone* e *D. Coppini*, in corso di stampa.
[9] *R. W. Jackson*, J. Biol. Chem. **131**, 469 (1939).
[10] *E. Besthorn* und *J. Ibele*, Ber. dtsch. chem. Ges. **27**, 913 (1894); **37**, 1236 (1904); **38**, 2127 (1905); **46**, 2762 (1913); **54**, 1333 (1921).
[11] *H. Wieland*, *O. Hettche* und *T. Hoshino*, Ber. dtsch. chem. Ges. **61**, 2371 (1928). — *F. Krollpfeiffer* und *K. Schneider*, Ann. Chem. **530**, 34 (1937).

Istituto di Chimica Farmaceutica dell'Università di Modena.

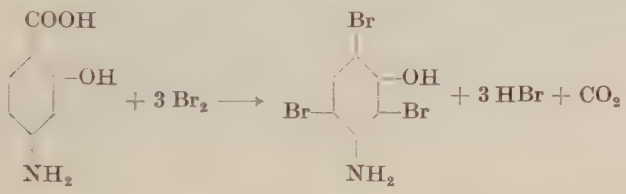
Determinazione per bromurazione dell'acido p-aminosalicilico nelle urine.

Di

Dino Coppini ed Enzo Costa.

(Trasmesso 2 agosto 1950.)

L'acido p-aminosalicilico, come ha messo in evidenza uno di noi[1], reagisce col bromo nella maniera seguente:



dà cioè nella bromurazione lo stesso prodotto che si ottiene dal 3-aminofenolo: il 2,4,6-tribromo-3-aminofenolo.

Sulla scorta di questi dati è stato elaborato un metodo di titolazione dell'acido p-aminosalicilico nelle preparazioni farmaceutiche, mediante soluzione di bromuro-bromato potassico, titolando iodometricamente il bromo in eccesso[1].

Questo metodo, che nella pratica ha dato ottimi risultati, è anche applicabile a miscele di acido p-aminosalicilico e 3-aminofenolo.

Nella stessa maniera si comporta, come abbiamo potuto osservare, l'N-acetilderivato dell'acido p-aminosalicilico (p. f. 220°—222°), mentre il diacetilderivato o acido 4-acetamido-2-acetossibenzoico (p. f. = 189°—190°), se non subisce azioni idrolitiche, non assorbe bromo.

Questa comunicazione riguarda l'estensione del metodo per bromurazione alla determinazione dell'acido p-aminosalicilico nelle urine.

Come è noto i metodi di determinazione di questa sostanza nei liquidi biologici sono numerosi, ma tutti basati su reazioni colorimetriche che utilizzano la diazotazione e successiva copulazione con amine e fenoli, la condensazione con dimetilaminobenzaldeide, la reazione con

cloruro ferrico, la decarbossilazione dell'acido p-aminosalicilico a 3-aminofenolo con successiva diazotazione e copulazione.

Nelle urine noi determiniamo l'acido p-aminosalicilico dopo averlo estratto con etere etilico, il quale, così come è stato messo in evidenza da altri AA.[2] a proposito di uno studio su alcuni metaboliti del salicilato sodico, non estrae quantità sensibili di sostanze che assorbono bromo.

Il metodo, che si può considerare semimicrochimico, è basato sulla acidificazione dell'urina a p_H 2,5, estrazione dell'acido p-aminosalicilico con etere etilico, distillazione dell'etere, bromurazione dello acido p-aminosalicilico con bromuro-bromato potassico in presenza di acido acetico e acido cloridrico, ed infine titolazione dell'eccesso di bromo per via iodometrica con tiosolfato sodico.

La determinazione è stata eseguita anche dopo idrolisi acida, sia per bromurazione nel residuo dell'estratto etereo, sia per via colorimetrica sull'urina ed i risultati sono stati sempre concordanti.

Nell'urina l'acido p-aminosalicilico ed il suo N-acetilderivato sono le forme più importanti di eliminazione.

I nostri risultati dimostrerebbero, per lo meno nei casi che abbiamo esaminato, che il bromo assorbito prima dell'idrolisi e quello assorbito dopo l'idrolisi è praticamente lo stesso.

Tuttavia è a nostro parere conveniente praticare sull'urina una idrolisi preliminare per essere certi che piccole quantità di eventuali metaboliti che non assorbono bromo senza idrolisi, sfuggano alla determinazione.

Questo metodo dà buoni risultati per quantitativi di acido p-aminosalicilico dell'ordine di mg 0,5 per ml di urina.

Riassunto.

La determinazione dell'acido p-aminosalicilico nelle urine è basato sull'estrazione dell'acido p-aminosalicilico (p_H 2,5) con etere etilico, distillazione dell'etere, bromurazione con bromuro-bromato potassico e titolazione dell'eccesso di bromo per via iodometrica con tiosolfato sodico.

Dalle urine che non contengono acido p-aminosalicilico, nelle stesse condizioni di esperienza l'etere non estrae quantità sensibili di sostanze che assorbono bromo.

Gli AA. hanno studiato anche il comportamento dell'N-acetil- e dell'O-N-diacetilderivato dell'acido p-aminosalicilico; mentre il primo si comporta alla bromurazione come l'acido p-aminosalicilico consumando 3 Br_2, il diacetilderivato, se non subisce azioni idrolitiche, non assorbe bromo.

E' consigliabile eseguire la determinazione dopo idrolisi acida.

Questo metodo dà buoni risultati per quantitativi di acido p-aminosalicilico dell'ordine di mg 0,5 per ml di urina.

Zusammenfassung.

Die Bestimmung der p-Aminosalicylsäure im Harn erfolgt durch Extraktion mit Äther bei p_H 2,5, Abdestillation des Äthers, Bromierung mittels Kalium-Bromid-Bromat und Rücktitration des Bromüberschusses auf jodometrischem Wege.

Harn, der frei ist von p-Aminosalicylsäure, werden mittels Äther keine Brom verbrauchenden Stoffe entzogen.

Das Verhalten des N-Acetylderivates der p-Aminosalicylsäure und des O-N-Diacetylderivates wurde untersucht: erstere Verbindung verhält sich bei der Bromierung wie die nicht acetylierte Säure selbst und verbraucht 3 Moleküle Brom. Das Diacetylderivat unterliegt keiner hydrolytischen Spaltung und verbraucht kein Brom. Es empfiehlt sich, die Bestimmung nach saurer Verseifung durchzuführen.

Die beschriebene Methode gibt gute Resultate bei Anwesenheit von etwa 0,5 mg p-Aminosalicylsäure pro ml Harn.

Summary.

The determination of p-aminosalicylic acid (PAS) in urine is accomplished by extraction with ether at $p_H = 2,5$, distillation of the ether, bromination by means of $KBrO_3$-KBr, and back-titration of the excess bromine iodometrically.

No bromine-consuming materials are extracted by ether from urine which is free of PAS.

The behavior of the N-acetyl derivative of PAS and of the O-N-diacetyl derivative was investigated: the former behave like the non-acetylated acid toward bromination and consumes 3 molecules of bromine. The diacetyl derivative undergoes no hydrolytic splitting and consumes no bromine. It is best to make the determination after acid saponification.

The method described here gives good results in the presence of about 0,5 mg PAS per ml of urine.

Résumé.

Le dosage de l'acide p-aminosalicylique (PAS) dans l'urine a lieu par extraction avec l'éther à p_H 2,5, évaporation de l'éther, bromuration par le mélange bromure-bromate et titrage en retour de l'excès de brome par iodométrie. L'urine exempte de PAS ne se laisse pas enlever par l'éther de substance consommant du brome.

On a étudié le comportement du dérivé N-acétylé du PAS et du dérivé O-N-diacétylé; le premier de ces composés se comporte par bromuration comme l'acide non acétylé lui-même et consomme 3 mol. de brome. Le dérivé diacétylé ne subit aucune hydrolyse et ne consomme pas de brome. Il se recommande pour opérer le dosage après saponification acide. La méthode décrite donne de bons résultats en présence d'environ 0,5 mg PAS par ml d'urine.

Bibliografia.

[1] *D. Coppini*, Il Farmaco **4**, 526 (1949).

[2] *Eleanor M. Kapp* e *A. F. Coburn*, J. Biol. Chem. **145**, 549 (1942).

Ministère de l'Agriculture, Institut National Agronomique, Paris, Laboratoire de Physiologie.

Sémi-microdosage de quelques constituants du lait par séparation chromatographique.

Par

J. Sternberg*, J. Colas et T. Kahn.

Avec 10 figures.

(Reçu le 18 septembre 1950.)

La méthode chromatographique a permis, grâce à sa simplicité et à sa fidélité, l'élaboration de nombreux moyens de séparation et de dosages dans des champs variés de la chimie.

Les techniques reposant sur ce principe s'appliquent surtout à des mélanges ayant les mêmes propriétés en ce qui concerne leur solubilité. La séparation d'un mélange complexe de corps ayant des coefficients de partage différents dans deux ou plusieurs solvants peut-être faite à l'aide de la chromatographie de partage: c'est le procédé de choix pour la séparation des amino-acides employé par plusieurs auteurs: citons parmi les nombreuses techniques celles indiquées par *Moore* et *Stein*[1] sur la colonne d'amidon et par *Partridge*[2] sur la colonne d'échangeurs d'ions.

Mais les difficultés augmentent dès qu'il s'agit de séparer un mélange de corps dont les solvants sont de nature différente; c'est le cas de la séparation des constituants des humeurs naturelles telles que le sang, le lait, la lymphe, etc.

La séparation des différentes fractions du lait est en effet très difficile si l'on veut obtenir tous les constituants avec le minimum de dénaturation possible. Les conditions physico-chimiques dans lesquelles se trouvent les constituants du lait lui confèrent une homogénéité particulière. Ce milieu complexe, mélange de minéraux, de glucides, de lipides et de protéides, est caractérisé par l'équilibre maintenu problablement par la micelle de caséine, unie physiquement aux graisses par une liaison analogue à

* Adresse actuelle: Institut de Microbiologie et d'Hygiène de l'Université de Montréal, Canada.

une cénapse lipoprotéique (*Macheboeuf*)[3] et électriquement à quelques éléments minéraux. La caséine, mélange de plusieurs protéines différentes en ce qui concerne leurs propriétés physiques et chimiques (*Cherbuliez*)[4]: taux en amino-acides, en P, point isoélectrique et mobilité électrophorétique, se trouve dans le lait dans un état colloïdal assez complexe. Le schéma suivant indique l'état actuel de nos connaissances sur ce problème (fig. 1).

Le noyau amino-acide de la protéine est entouré par une zone ionisée formée par les cations Ca^{++} et les anions PO_4^{---} qui neutralisent, les premiers, les fonctions COOH libres des différents acides aminés, les seconds les fonctions NH_2 libres ainsi que le groupement alcoolique CHOH de la sérine. Ce complexe: radical organique + acide phosphorique + calcium, forme la micelle électriquement neutre qui baigne dans un liquide intermicellaire où se trouvent des ions libres. Les phosphates minéraux qui n'entrent pas dans la molécule de phospho-sérine sont fixés sur la fonction aminée de la lysine (*Van der Burgh*)[5]. On ne peut séparer que de 40 à 50% des phosphates par dialyse, le reste étant lié aux protéines (*Rona*)[6]. Autour de la molécule de caséine ainsi constituée, une couche protectrice de phospholipides assure la stabilité du système colloïdal (*Cherbuliez*)[4]. D'ailleurs une explication plausible de la multiplicité des caséines serait fournie par l'hypothèse de *Linderström-Lang*[7], qui accorde à la caséine $\varkappa$ un rôle de colloïde protecteur vis-à-vis de la caséine β.

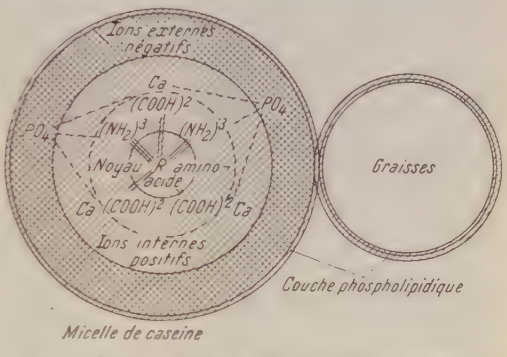


Fig. 1. Structure physique de la micelle de caséine.

Près de ce complexe minéralo-protéique se trouvent les graisses neutres unies probablement à celui-ci par une liaison lipo-protéique, analogue à celle décrite par *Macheboeuf*[3] dans le sang. Le lactose ainsi que la fraction de phosphore estérifié et l'acide citrique se trouvent libres dans ce complexe lipo-protéique-minéral.

Il ressort de ce bref aperçu que la complexité et la stabilité du lait sont dûes aux différentes liaisons électriques dans l'intérieur de la micelle d'une part et entre les différents constituants d'autre part.

Il est tout naturel de penser qu'une séparation trop brutale de ce complexe provoquerait la dénaturation de ses constituants, dont la caséine est le corps le moins stable.

La précipitation de la caséine à son point isoélectrique (4,6 pour la caséine α, 4,9 pour la caséine β et 5,2 pour la caséine γ) retient dans le coagulum protéique une certaine quantité de graisses dont l'élimination est fort difficile. Les techniques de *Warner*[8] et de *Cherbuliez*[4] destinées uniquement à la purification des différentes fractions de caséine n'indiquent pas les procédés pour l'obtention des autres constituants.

Fig. 2. Chromatographie du lait.
A = Colonne chargée à 300 mm;
C = Pièce intermédiaire filtrante;
D = Robinet à deux voies pour vide;
E = Ampoule à séparation de 300 ml.

Les recherches sur la sécrétion lactée faites sur les petits animaux de laboratoire ne permettent pas l'application de ces méthodes qui nécessitent de grandes quantités de lait. Une technique de micro-dosage a été indiquée par *Eysseric*[9] surtout en ce qui concerne le dosage du lactose et des protéines. La méthode chromatographique nous a permis la mise au point d'un procédé de séparation des constituants du lait qui n'en utilise que 5 ml.

Description de l'appareil.

La colonne de chromatographie employée (fig. 2) se compose de:

1° La colonne proprement dite, tube cylindrique de 600 mm de longueur et de 25 mm de diamètre. Le tube A est muni de rodages n° 4 à ses deux extrémités. A son extrémité supérieure s'adapte une ampoule B de 500 ml de capacité. A l'extrémité inférieure de la colonne s'insère une pièce intermédiaire C, constituée par un entonnoir cylindrique à rodage 4 à sa partie supérieure et à rodage 2 à sa partie inférieure. Une plaque de verre percée de 25 à 35 trous de 0,5 mm de diamètre est soudée à la base de l'entonnoir. La partie inférieure de l'entonnoir possède de plus une tubulure latérale de 10 mm de diamètre extérieur, qui se termine par deux tubes, l'un sert à établir la communication de la colonne avec la pompe à vide, l'autre à la rentrée de l'air dans le système; un robinet à deux voies D assure ce fonctionnement. Un tube intérieur E de 6 mm de diamètre et de 90 mm de long assure la filtration à vide du système. Un jeu d'entonnoirs à séparations de 200, 300 et 500 ml sont reliés par un rodage 2 à la pièce C, de telle manière que le tube pénètre d'au moins 30 à 40 mm dans l'intérieur de l'entonnoir. Ainsi, l'on peut éviter un vide trop poussé dans l'entonnoir qui entraînerait des pertes de substance.

2° Le système est relié à un piège à vide, puis à une colonne remplie de pierre ponce et d'acide sulfurique, qui assure la liaison avec une pompe à vide (*Hivac*, pompe à huile).

Matériel employé.

Nous avons utilisé un mélange d'alumine Prolabo et de sable de Fontainebleau. La proportion qui assure la meilleure vitesse de filtration est de 2 parties de sable pour 1 partie d'alumine. Ces poudres sont soigneusement mélangées par agitation pendant une heure. La quantité de mélange est habituellement de 200 à 210 g (70 g d'alumine et 140 g de sable) qui donne une hauteur de 300 mm de colonne filtrante. Dans certains cas on a employé la moitié de cette quantité, correspondant à 140—150 mm de hauteur de colonne.

Technique.

1° Préparation de l'alumine. La poudre d'alumine est amenée au p_H voulu en mélangeant une quantité convenable d'alumine acide et d'alumine alcaline et en les laissant 48 heures au minimum dans un liquide tampon phosphaté jusqu'à ce que le p_H soit constant. Le tampon est ensuite éliminé par des lavages successifs jusqu'à la disparition des phosphates minéraux, la poudre est ensuite desséchée à 100° et mélangée au sable. Dans certaines expériences le tampon phosphaté a été remplacé par d'autres mélanges, savoir: acide borique/chlorure de potassium, véronal sodique/NaOH; ces changements ont été faits en vue d'assurer une précaution supplémentaire dans la séparation des phosphates minéraux du lait, afin que le phosphore éventuellement adsorbé par la colonne ne soit pas entraîné par l'éluant.

2° Mise en route. Le lait est dilué à 10% dans de l'eau distillée. Une concentration plus grande (au-dessus de 15%) colmate la région supérieure de la colonne par un dépôt de graisses.

a) On passe d'abord 200 ml d'eau distillée sur la colonne, qui en retient environ 55 à 60 ml. Ainsi l'on a une alumine hydratée à saturation (environ 30 à 35%) le reste de l'eau étant retenu entre les grains d'alumine.

b) Immédiatement après on passe le lait, en ayant soin de temps en temps d'agiter la région supérieure de la colonne sur une épaisseur de 10—15 mm afin d'éviter le colmatage de l'alumine.

La quantité de lait à passer dépend du but de la séparation recherchée; si l'on désire faire une étude du passage d'un constituant donné en fonction du temps ou de la quantité d'éluant, on utilise 200 à 250 ml. L'alumine se sature en caséine et laisse passer le surplus; ainsi la colonne réalise une sorte de filtration sélective.

Si, par contre, on cherche seulement la séparation des constituants, on met de 50 à 60 ml qui suffisent à la saturation de l'alumine. Les consti-

tuants se fixent dans la partie supérieure de la colonne, dans les 10 premiers centimètres. Pour bien préciser le lieu de fixation des constituants, il est utile d'ajouter au lait dilué quelques gouttes d'un indicateur coloré. Nous avons employé le mélange suivant qui nous a donné les meilleurs résultats:

Bleu de bromothymol	0,50 g
Phénolphtaléine	0,50 g
Bleu de Nil (sulfate).....	0,10 g
Rouge de méthyle	0,25 g
Alcool 95°.....	50 ml.

On ajoute 1 goutte de l'indicateur pour chaque ml de lait dilué; le lait prend alors une teinte verte qui vire au bleu quand il se fixe sur la colonne. La limite inférieure de la fixation est indiquée par une ligne plus ou moins ondulée, située à 10 cm environ du haut de la colonne. Cette ligne se déplace seulement quand commence l'élution des protéines. Ainsi il a été possible de rendre visible la migration des constituants incolores.

c) Après le passage du lait, la colonne est lavée à l'eau distillée jusqu'à la disparition complète de l'azote dans les eaux de lavage; 200 à 250 ml suffisent en général. L'eau recueillie est claire et limpide dans les colonnes à saturation (où 50 à 60 ml de lait dilué ont été employés) et elle est opalescente comme une solution de blanc d'œuf, dans le cas des colonnes à sursaturation.

d) Le lavage à l'eau est suivi par l'élution des graisses: on emploie de 400 à 500 ml d'un mélange à parties égales de benzène et d'éther de pétrole. Le passage de cet éluant se fait en chute libre, ou en faisant un vide léger par le blocage du robinet D dans une position intermédiaire. Un vide trop fort, outre le désavantage d'une extraction incomplète des graisses, provoque par l'évaporation rapide de l'éther de pétrole une congélation de l'eau résiduelle qui finit par obturer la plaque perforée filtrante. La durée de passage du mélange des solvants est en général de 10 à 12 heures; aussi a-t-on avantage à laisser la colonne en chute libre pendant la nuit.

e) La caséine est éluée par 500 à 800 ml de NaOH N/25 à N/50. L'élution se fait en 2 temps: 1° décollement de la protéine fixée sur l'alumine; 2° migration de la solution de caséinate de soude. Le passage de la solution est nettement mis en évidence par les variations de p_H des éluats et par l'aspect des solutions recueillies. En effet, le p_H des premières solutions, environ 150 à 200 ml de soude, est neutre ou légèrement acide (entre 6,30 et 7,00). Dès que les éluats se chargent en protéines le p_H monte en flèche jusqu'à atteindre des valeurs au-dessus de 11,50. L'aspect du liquide change aussi, il devient opalescent et de plus la présence des

protéines est indiquée par un moussage abondant, qui disparaît dès que leur élution est complètement terminée. Enfin l'indicateur est entraîné par les élutions alcalines et constitue un moyen supplémentaire d'identification; il y a un certain parallélisme entre la couleur de l'éluant et la quantité de protéine entraînée.

f) Un lavage à l'eau distillée — 200 à 300 ml — assure l'élimination complète de l'éluant alcalin et des protéines restantes. Le p_H baisse jusqu'aux alentours de 7,00 et même à des valeurs légèrement inférieures.

g) L'élution des phosphates minéraux se fait à l'aide de 300 ml environ d'une solution fortement acide de SO_4H_2 (1,5 N à 2 N). La plus grande partie des phosphates se trouve dans les premières fractions.

h) On termine l'élution en lavant soigneusement à l'eau distillée, jusqu'à la disparition de l'acidité des eaux de lavage.

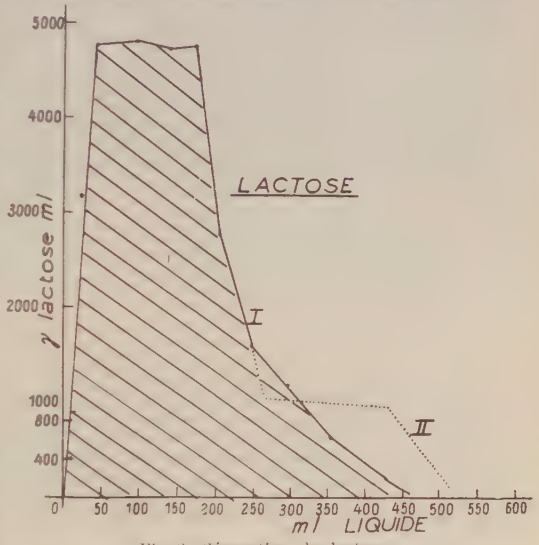


Fig. 3. Séparation du lactose.

Résultats.

I. Séparation du lactose.

Le lactose est le premier constituant du lait qui passe à travers la colonne, apparemment par un simple mécanisme de filtration. Les courbes représentant le passage du lactose sur une colonne à saturation et sur une colonne à sursaturation sont semblables, savoir:

une augmentation très rapide de la concentration qui atteint le taux de 5000 γ par ml de filtrat après le passage des 25 à 30 premiers millilitres.

Un plateau de concentration maxima, qui correspond à celle du lactose dans le lait dilué à 10%: environ 5000 à 5500 γ/ml. Ce plateau se maintient avec de très légères oscillations, qui ne dépassent pas 5% de la concentration maxima pendant toute la traversée du lait.

Une descente brusque dès que la totalité du lait est passée; toutefois la courbe a une pente moins accentuée qu'au début et présente quelquefois un second plateau, de moindre importance, aux alentours de la concentration de 50 γ/ml. Habituellement la concentration en lactose s'annule après 40 à 50 ml d'eau de lavage.

Le p_H de l'alumine n'influence d'aucune manière les caractéristiques de cette courbe. Ce fait renforce l'hypothèse selon laquelle il s'agirait d'une simple filtration du lait. La solution est claire et limpide, incolore ou très légèrement jaunâtre dans quelques échantillons de lait. Le poids sec de ces élutions représente, avec des variations n'excédant pas 2%, celui d'une solution de lactose dans l'eau ayant la même concentration que celle des éluats.

La quantité de lactose retrouvée dans le filtrat représente en moyenne 95 à 98% de la quantité de sucre dosé dans le lait avant le passage sur la colonne. La difference n'a pas été retrouvée dans l'alumine lavée à l'eau à la fin des élutions. Le dosage du lactose dans le lait dilué nécessitant une défécation cadmique — inutile dans le lait filtré sur colonne alors complètement dépourvu de graisses et de protéines — il est possible que cette différence soit due aux méthodes différentes de dosage. On peut conclure, en ce qui concerne le lactose, que le rendement est quantitatif.

Le sucre obtenu donne les réactions caractéristiques du lactose-osazone, (réaction de *Cole*) et de l'acide mucique. Le phosphore organique ou minéral étant absent des solutions, il est probable que le lactose ne se trouve pas sous forme estérifiée.

II. Graisses.

Les solutions obtenues après filtration sur colonne sont complètement dépourvues de graisses, quel que soit l'éluant en solution aqueuse. Toutefois, si le dégraissage n'a pas été complet, l'élution alcaline entraîne une certaine quantité de graisses à l'état de savons, dont on se débarrasse en agitant le précipité protéique avec 50 à 100 ml de potasse alcoolique à 1% et d'éther en parties égales.

Le liquide d'extraction éthéro-pétrolique et benzénique donne après élimination des solvants, un résidu de couleur jaune foncé ayant quelquefois l'aspect cireux. Le poids sec correspond à celui d'un extrait obtenu dans la même quantité de lait par épuisement au *Soxhlet* ou au *Kumagawa* par l'éther de pétrole et le benzène, pendant 20 heures.

Le rendement des graisses peut présenter des variations de l'ordre de 6 à 8% des valeurs maxima obtenues, si le passage des solvants est trop rapide. Le p_H de la colonne est sans influence sur le rendement. Mais l'hydratation de la colonne baisse jusqu'à ce que l'eau retenue entre les grains d'alumine soit complètement éliminée. On reconnait ce phénomène de deshydratation à ce que de temps en temps une goutte d'eau se mélange à la solution parfaitement claire des solvants. Cependant l'hydratation proprement dite de l'alumine persiste (30 à 35%).

Les graisses obtenues n'ont pas été analysées complètement; on a seulement recherché la concentration en phosphore lipidique dont le taux.

dans les conditions de l'expérience, s'est toujours montré au-dessous des limites du dosage aussi bien pour les colonnes à saturation que pour les colonnes à sursaturation.

III. Protéines.

L'élution des protéines est complètement différente suivant que l'on a affaire à des colonnes à saturation ou à sursaturation et surtout suivant le p_H de l'alumine.

Les méthodes employées pour leur identification ont été: dosage de l'azote total et résiduel (le même dosage a été effectué sur les élutions après dialyse de 24 à 48 heures), précipitation de la caséine au point isoélectrique par l'acide acétique 1,5%, séparation et purification des caséines α, β et γ, d'après la technique indiquée par *Cherbuliez*[4], dosage du phosphore protéique, de la sérine et du glycocolle et chromatographie sur papier des hydrolysats de caséines isolées par différents procédés.

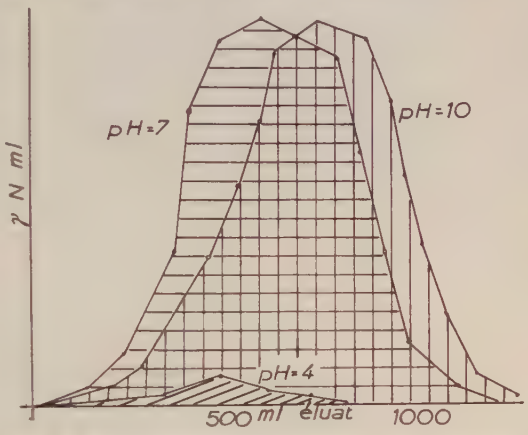


Fig. 4. Elution des protéines: influence du p_H de l'alumine.

a) *Alumine acide* p_H: 4,5.

La quantité d'azote total retrouvée dans l'élution faite avec une solution de soude N/20 ne représente que 3,5% de l'azote total du lait mis dans la colonne. Les éluats sont limpides, ne donnant aucun précipité après addition d'acide acétique. D'ailleurs, le p_H des éluats est acide, variant entre 4,50 et 5,00. Il est fort probable que l'azote retrouvé est de l'azote résiduel, d'autant plus que sa concentration représente celle de l'azote non protéique dans le lait.

b) *Alumine neutre* p_H: 7,10.

La quantité d'azote total retrouvé dans la totalité des éluats alcalins représente de 90 à 100% de celui dosé dans le lait total. Les solutions sont neutres jusqu'à l'apparition des protéines, puis elles deviennent de plus en plus alcalines jusqu'à atteindre le p_H de la soude employée comme éluant

c) *Alumine alcaline* p_H: 10,30.

La quantité d'azote retrouvée est égale à celle dosée dans les colonnes neutres, la seule différence résidant dans l'apparition plus rapide de la protéine dans les élutions. Le p_H se maintient autour de 10, baisse vers la neutralité pendant le lavage à l'eau et revient ensuite à des valeurs alcalines.

Influence de la saturation de la colonne.

a) *Colonne a saturation.*

La quantité de protéine qui suffit à saturer la colonne d'alumine contenant 70 g d'alumine au p_H neutre (toutes les expériences qui suivent sont faites au p_H 7,00 à 7,50) correspond à une concentration de 20000 à 25000 γ d'azote total pour le volume total du lait. Nous avons indiqué que la fixation du lait se fait dans le cinquième supérieur quel que soit le volume mis en jeu au début de l'expérience. En effet, un excès de protéine ne se fixe pas sur une zone plus étendue de la colonne mais s'élimine dans le filtrat.

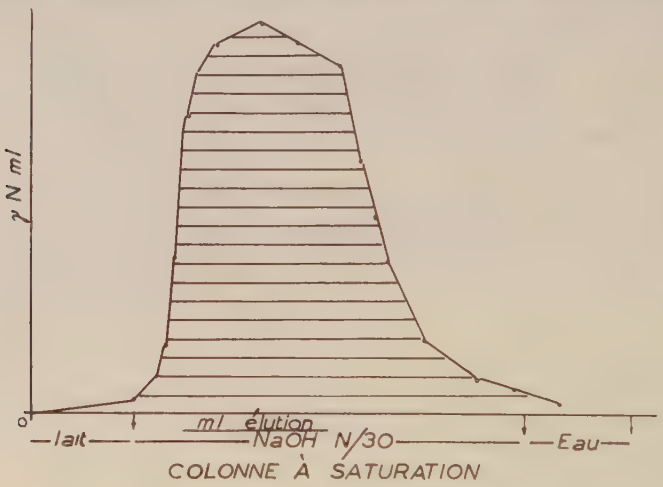


Fig. 5. Elution des protéines: colonne à saturation.

L'aspect de la courbe d'élution dans une colonne à saturation représentant la concentration de l'azote total en fonction de la quantité d'éluant, rappelle la forme d'une parabole assez allongée, avec un maximum aux deux-tiers de l'élution alcaline.

La solution de caséinate de sodium fortement opalescente, laisse dans certains cas un dépôt floconneux, riche en azote, précipitant au p_H 8,90 au lieu du point isoélectrique de la caséine. La précipitation à l'acide acétique 1,5% donne au p_H 4,60 un produit d'aspect cireux, insoluble dans l'éther ou l'alcool (il ne s'agit donc pas de savons alcalins) et dont le pourcentage en azote est de 15,5 à 15,8%. Le précipité contient de 0,7 à 0,8% de phosphore organique, ce qui est exactement la proportion de phosphore contenue dans la caséine.

Une séparation des fractions α, β et γ d'après la technique indiquée par *Cherbuliez*[4] montre que la presque de la caséine précipitée est la fraction α.

Des recherches sont en cours pour l'identification des différentes protéines précipitées dans l'éluat alcalin, par les méthodes sus-indiquées

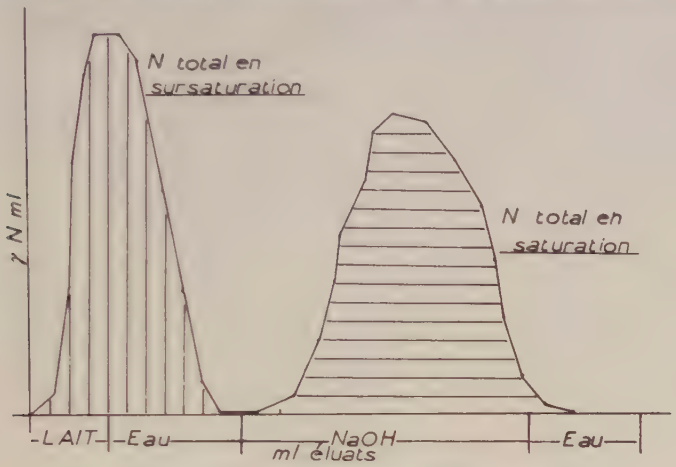


Fig. 6. Elution des protéines: colonne à sursaturation.

ainsi que par d'autres procédés physico-chimiques (électrophorèse, spectre infra-rouge).

Un fait est certain, c'est que l'absence complète de graisses, qu'il s'agisse de graisses neutres ou de phospholipides, apporte une modification dans l'état physique de la caséine.

b) *Colonne à sursaturation.*

Dans ces colonnes, les protéines récoltées se divisent en deux fractions distinctes:

1° La protéine fixée dans la colonne ne diffère pas de celle précédemment décrite dans la colonne à saturation, en ce qui concerne sa concentration et ses caractéristiques physico-chimiques.

2° La protéine qui passe en sursaturation est nettement différente de la première. En effet, elle se trouve dans une solution opalescente complètement dépourvue de graisses. Le lactose qui passe en même temps dans le filtrat peut être éliminé par une dialyse de 24 heures sous pression contre de l'eau distillée.

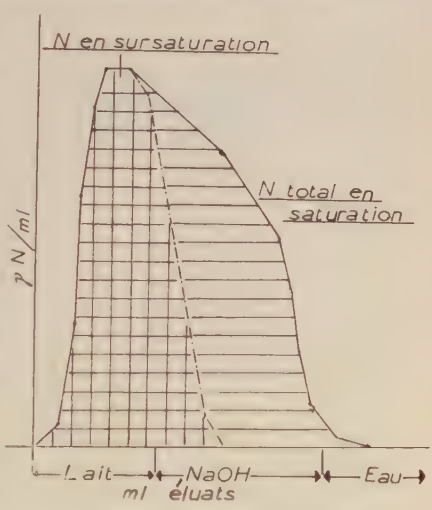


Fig. 7. Elution des protéines: colonne à sursaturation.

Elle contient les mêmes taux d'azote, environ 15,7% et de phosphore 0,7—0,8%. Elle précipite toujours au point isoélectrique (p_H: 4,60).

Si après avoir recueilli toutes les protéines en sursaturation, on passe immédiatement un éluant alcalin, la courbe d'élution a la même forme parabolique, mais naturellement, plus étendue que la première (Graphique 5). Si, au contraire, la colonne est lavée par l'eau distillée ou par un tampon quelconque, la concentration en azote total baisse rapidement, puis remonte quand on passe la soude. Ainsi, l'on peut séparer les

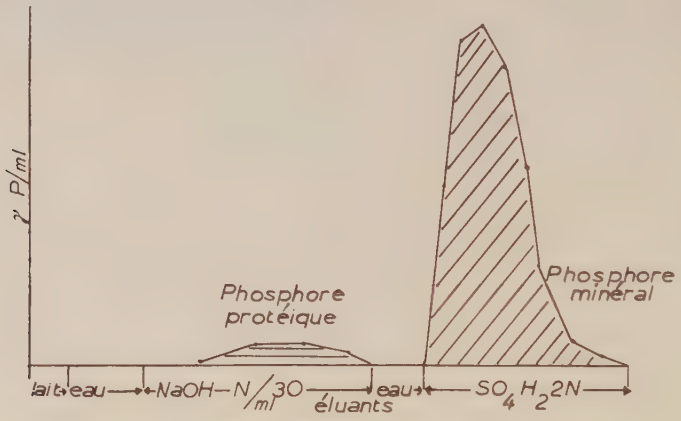


Fig. 8. Elution du phosphore.

deux fractions protéiques, la protéine de saturation passant après celle de sursaturation. Les propriétés physico-chimiques de la protéine de sursaturation la rapprochent de la caséine naturelle.

IV. Minéraux.

Des minéraux du lait seuls les phosphates ont été bien étudiés jusqu'à présent. (Le calcium minéral et protéique suit plus ou moins le sort du phosphore.) On peut identifier la présence, la localisation et la migration du phosphore par le procédé suivant : après lavage à l'eau distillée jusqu'à disparition complète de la soude, on passe 25 à 30 ml de molybdate d'ammonium à 5%, puis l'éluant acide (SO_4H_2 1,5 N—2 N). La colonne se colore alors en jaune dans la zone qui contient les phosphates minéraux, jaune qui peut virer au bleu si on fait la réaction classique du phosphomolybdate d'ammonium par un réducteur (hydroquinone, acide x-aminonaphto-sulfonique).

La courbe d'élution du phosphore présente un maximum très accusé; la plus grande partie se retrouve dans le premier quart.

Le rendement de la méthode est quantitatif.

Une application de la séparation du phosphore a été faite en employant le radiophosphore sous forme minérale. La séparation des fractions

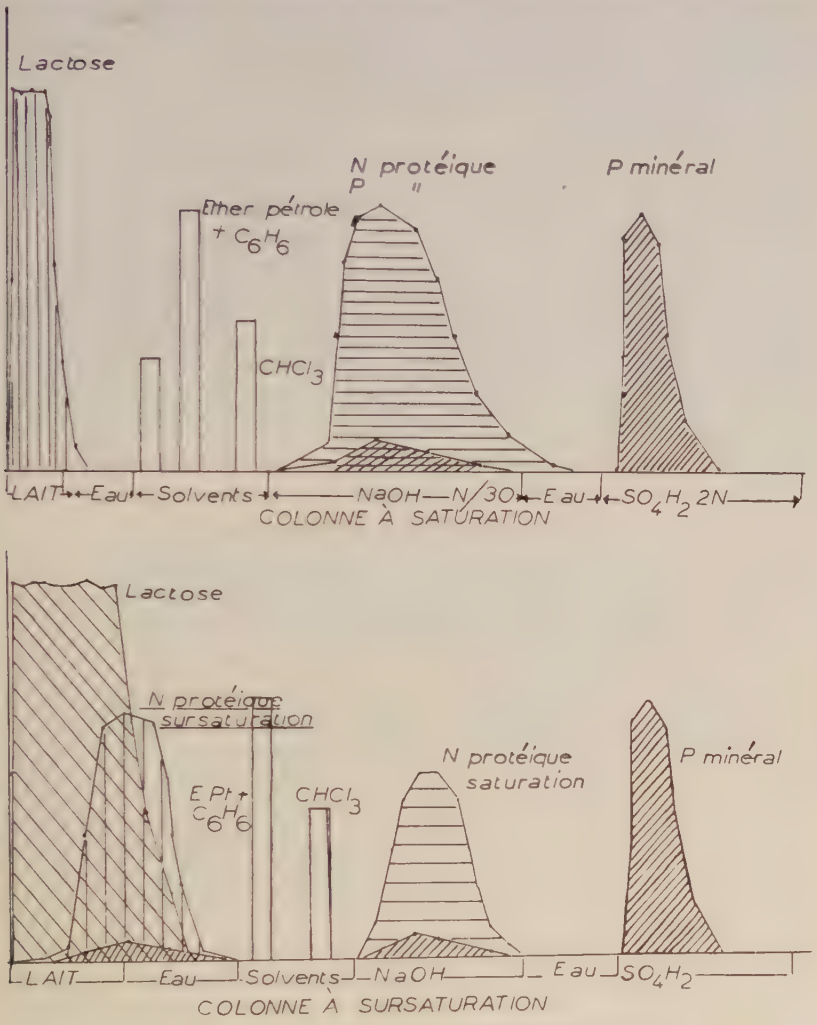


Fig. 9 et 10. Séparation des constituants du lait.

phosphorées marquées se fait de la même manière que celle des constituants non radioactifs (*J. Sternberg*)[10].

Discussion des résultats.

Le mécanisme de la séparation des différentes fractions du lait peut s'expliquer par l'état physique de ses constituants. Dans le schéma de

constitution de la micelle de caséine (fig. 1), nous avons constaté que l'équilibre électrique de la caséine exige la présence des ions minéraux et que l'équilibre colloïdal nécessite une couche phospholipidique, ainsi qu'une liaison étroite, avec les lipides neutres. Seul, le lactose n'entre pas apparemment dans ce système.

La chromatographie peut séparer les éléments suivant les trois processus suivants.

1° L'adsorption vraie, qui ne peut se produire sur l'alumine qu'en milieu de solvants organiques. Ici le milieu étant aqueux, cette hypothèse doit être éliminée.

2° La chromatographie de partage, où seul le coefficient de partage de la solubilité d'un corps entre deux solvants différents peut produire une variation dans la fixation des corps sur la colonne. Mais dans la chromatographie de partage seuls les constituants de composition chimique voisine peuvent être séparés, comme les acides aminés ou les peptides. La composition hétérogène du lait, formé de minéraux et de corps organiques de nature complètement différente, ne permet pas de retenir ce mécanisme.

3° L'échange d'ions, procédé de choix dans la séparation des substances hydrosolubles, où la charge électrique des substances dirige la séparation. Dans une colonne d'échangeurs d'ions, réalisée habituellement à l'aide de résines synthétiques, les substances neutres ne sont pas adsorbées, les corps acides sont retenus par un échangeur d'anions et les bases par un échangeur de cations.

Si la séparation des constituants du lait est faite par ce mécanisme dans la colonne d'alumine, alors un mélange d'alumine avec un échangeur d'ions doit accélérer ou freiner l'adsorption suivant la nature de l'échangeur. Nous avons, en effet, vérifié cette hypothèse en ajoutant à une colonne d'alumine de p_H 7,10 qui devait donner un rendement de 60% de l'azote total, une couche mince d'amberlite tantôt échangeur de cations, tantôt échangeur d'anions.

Dans le premier cas (alumine au p_H 7,10 avec une couche d'échangeur de cations) le rendement de l'azote total est tombé à 0 et le p_H de la solution éluée était voisine de 7,60. Tout se passait comme si l'on avait affaire à une colonne d'alumine acide.

Par contre, dans le cas d'une alumine au p_H 7,10 avec une couche d'échangeur d'anions, le rendement a été augmenté de 20%, le p_H du filtrat se maintenant dans la neutralité.

L'hydratation de l'alumine est un facteur indispensable mais non déterminant; un mélange artificiel de caséine, de lactose et de phosphates minéraux, mais sans graisses, ne se comporte pas comme le lait lui-même. Il faut donc conclure que la présence des graisses est aussi un facteur

indispensable, de même valeur que celui de l'hydratation de l'alumine. Mais c'est la présence simultanée de ces deux facteurs qui est déterminante.

D'après *Weiss*[11] les substances tensioactives, telles que les acides gras, les lécithines ou les graisses neutres peuvent se fixer sur l'alumine en donnant un «adsorbat primaire». Cet adsorbat acquiert ainsi les propriétés d'échangeur d'ions.

Dans le cas du lait, il est possible que les graisses se fixent sur le grain d'alumine préalablement hydraté et forment une couche tensioactive qui joue le rôle d'échangeur d'ions. Ainsi l'on pourrait envisager une explication du mécanisme de la sursaturation par une limite atteinte dans la fixation des graisses sur l'alumine, limite dictée par le rapport intérieur entre le taux des graisses et des protéines du lait. Peut-être serait-il possible de faire varier l'«activation» de la colonne en changeant par des moyens extérieurs le rapport graisses/protéines. Des expériences sont en cours pour la vérification de cette hypothèse.

Résumé.

La complexité de l'état physique dans lequel se trouvent les constituants du lait à l'état naturel fait de leur séparation un problème difficilement soluble, surtout quand il s'agit d'analyser de petites quantités.

Une séparation des constituants du lait est possible sur une colonne d'alumine hydratée.

Le mécanisme de cette séparation réside dans un échange d'ions, résultant des propriétés conférées par la couche de graisse déposée sur le grain d'alumine hydraté.

Le lactose, le premier constituant recueilli, passe par simple filtration indifféremment du p_H de l'alumine.

Les protéides sont élués par une solution alcaline. Le p_H de l'alumine a une grande influence à la fois sur leur adsorption et sur leur élution. Une alumine acide retient la presque totalité des protéines, tandis qu'une alumine neutre ou légèrement alcaline en permet une élution facile.

Dans les conditions de nos expériences l'alumine employée ne peut adsorber qu'une quantité déterminée de protéines. L'excès passe immédiatement dans le filtrat. Ainsi, l'on peut différencier deux fractions protéiques qui sont récoltées après le passage du lait dans la colonne: l'une dans le filtrat, quand la colonne est déjà saturée, l'autre dans l'éluat alcalin.

Les phosphates minéraux sont élués par une solution acide; leur rétention n'est pas influencée par le p_H de la colonne.

Zusammenfassung.

Die verwickelten physikalischen Verhältnisse unter den Bestandteilen der Milch im natürlichen Zustand macht deren Trennung zu einem schwierigen Problem, besonders wenn es sich um die Analyse kleiner Mengen handelt. Diese Trennung wird durch Verwendung einer Säule von Aluminiumoxydhydrat ermöglicht. Der Trennungsmechanismus beruht auf einem Ionenaustausch zufolge jener Umstände, die sich aus der Bindung des Fettes an das gekörnte Adsorptionsmittel ergeben. Die Lactose, der zuerst erhältliche Bestandteil, passiert das Aluminiumoxyd unabhängig vom p_H. Die Proteide werden alkalisch eluiert. Das p_H des Aluminiumoxyds ist von großem Einfluß auf deren Adsorption und Elution. Saures Aluminiumoxyd hält das Eiweiß fast zur Gänze zurück, während neutrales oder schwach basisches Aluminiumoxyd die Elution erleichtert. Unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen kann das verwendete Aluminiumoxyd nur eine bestimmte Menge der Eiweißkörper adsorbieren. Der Überschuß geht unmittelbar ins Filtrat. So lassen sich zwei Eiweißfraktionen unterscheiden, von denen sich die eine nach der Sättigung der Trennsäule im Filtrat, die andere im Eluat findet. Das anorganische Phosphat wird sauer eluiert; dessen Adsorption wird durch das p_H der Kolonne nicht beeinflußt.

Summary.

The complexity of the physical state, in which the constituents of milk occur naturally, makes their separation a difficult problem, particularly when small quantities are to be analyzed. The constituents of milk can be separated on a column of hydrated alumina.

The mechanism of this separation resides in an exchange of ions resulting from properties conferred by the layer of fat deposited on the grains of hydrated alumina.

Lactose, the first constituent collected, passes through by simple filtration, indifferent to the p_H of the alumina.

The proteins are eluted by means of an alkaline solution. The p_H of the alumina has a large influence both on their adsorption and elution. An acidic alumina retains practically all of the proteins, whereas a neutral or slightly alkaline alumina makes their elution easy.

Under the conditions of the author's experiments, the alumina employed could adsorb only a determinate quantity of proteins. The excess immediately passed into the filtrate. It is thus possible to differentiate two protein fractions, which are collected after the passage of the milk through the column: one in the filtrate, when the column is already saturated, the other in the alkaline eluate.

The mineral phosphates are eluted by an acid solution; their retention is not influenced by the p_H of the column.

Bibliographie.

[1] *S. Moore* et *W. H. Stein*, J. Biol. Chem. **176**, 337 (1948).

[2] *S. M. Partridge* et *R. G. Westall*, Biochem. J. **44**, 418 (1949).

[2a] *S. M. Partridge* et *R. C. Brimley*, Biochem. J. **44**, 513 (1949).

[2b] *S. M. Partridge*, Biochem. J. **44**, 521 (1949).

[3] *M. Macheboeuf*, Colloques Internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique XI, Les Lipides, p. 137–156, Paris, Edition du C. N. R. S. 1949.

[4] *E. Cherbuliez* et *P. Baudet*, Helv. Chim. Acta **33**, 398 (1950).
[5] *P. van der Burgh*, Netherlands Milk Dairy J. **1—2**, 69 (1947).
[6] *P. Rona* et *O. Michaelis*, Biochem. Z. **21**, 114 (1909).
[7] *E. Linderström-Lang*, Z. physiol. Chem. **76**, 176 (1928).
[8] *R. C. Warner*, J. Amer. Chem. Soc. **66**, 1725 (1944).
[9] *G. C. Eysseric*, Contribution à l'étude biochimique du lait. Thèse, Marseille, 1946.
[10] *J. Sternberg* et *G. Demaux*, C. r. acad. sci., Paris 231, 524 (1950).
[11] *D. E. Weiss*, Nature, **162**, 372 (1948).
[12] *E. Lederer*, Progrès récents de la chromatographie, Hermann et Cie, Paris 1949.
[13] *W. Kopaczewski*, Physico-Chimie du lait, Dunod, Paris 1950.
[14] *P. B. Hawk*, *B. L. Oser* et *W. H. Summerson*, Practical Physiological Chemistry, Blakiston Co., Toronto, 1949.
[15] *J. Loiseleur*, Techniques de Laboratoire, Masson, Paris 1947.

Chemical Institute, Faculty of Science, Tokyo University.

New Modified Colorimetric Method of Determination of Copper in Biological Materials with Sodium Diethyldithiocarbamate.

By

Kenjiro Kimura and **Yukio Murakami.**

(Received July 18, 1950.)

A. Introduction.

Sodium diethyldithiocarbamate was first prepared by *Delepine* in 1893[1], but its possible use as a color reagent for copper was initiated by *Callan* and *Henderson*[2]. The first trial of color comparison was made directly in a water solution with copper content never less than 100 γ and the stability of coloration could not be attained for longer than a little over an hour. To increase the sensitivity and stability of the coloration, *Conn* et al.[3] proposed the extraction method though it was not very successful. Nevertheless many workers followed in this track by studying numerous extractants, ether[4], chloroform[5], carbon tetrachloride[6], isoamylalcohol[7], etc., but the usual drawback to this method remained unchanged. Complete extraction of the colored matter was impossible, and hence the application of *Beer*'s Law was hindered. This persisting defect resulted in the necessity of making the color comparisons with *Lovibond* tintometer or in making relative comparisons with a series of standards treated in the same manner. In brief, the method remained both time-consuming and of low accuracy[8].

McFarlane[8] introduced the use of amyl alcohol to solve this difficulty, but unfortunately its use was unfavorably reported upon by several workers. *Nydahl*[9] reported that complete extraction can be practically accomplished by rigorously shaking from 200 to 300 times with carbon tetrachloride though the best results cannot be expected in all cases. On the other hand *Drabkin*[10] using a spectrophotometer in his critical study of the carbamate complex, reported fair agreement with *Beer*'s law for copper concentrations ranging from 0.02 to 0.1 mg in 10 ml of isoamyl acetate used as extractant.

Under these circumstances, the collaborative analytical work performed by the members of the Association of Official Agricultural Chemists in America proved the superiority of the carbamate method. However this did not solve their problem[11]. This method had to be carried out by the use of monochromatic light or blue or green filters. If these are used, though the range of concentration is limited, the relation between copper concentration and the extinction of the extracted solution is linear, or almost so.

During the war, the same difficulty was encountered when the authors had occasion to determine copper in biological materials, but it was easily overcome by the addition of hydroxylamine during the process of extraction. Thus the method acquired speed and accuracy. Many valuable reports[12] on the colorimetric determination of copper by carbamate method were published during or after the war. But, as it seems that the solution to this problem in question was not yet given, the authors were prompted to prepare for pubication the report of the method of determination now used in their laboratory.

This method consists of a preliminary process of separation with dithizone and the use of carbamate in the presence of hydroxylamine. The first step is performed by closely following the widely approved directions outlined by *Sandell*[13] for this determination. Hence this procedure will not be given here. The method given by *Sandell* was selected by the authors as a result of a quite extensive preliminary study of separation procedures including the hydrogen sulfide method[14] and ammonium hydroxide method[15]. These procedures were especially conducted with the object of selecting a method of separation which would concurrently determine Zn and Pb in aliquot portions of one sample.

B. Interference.

Sodium diethyldithiocarbamate does not react exclusively with Cu, but equally reacts with such metals as Bi, Fe, Mn, Ni, Co and Cr to form colored complexes and with Zn, Pb, Mg, Cd, Sb, Sn, Ti and Al to become turbid. Under the conditions of the extraction described below, the majority of these elements with the exception of Sb, Sn, Ti, Al and Cr form dithizonates. Consequently the interferences in this procedure must be considered. The dithizonates of Zn, Pb, and Cd, though extracted with copper, are completely transferrable into the acid solution isolated from the copper by shaking with 0.01 N HCl. Though Fe and Mn form dithizonates in their usual condition, they are only formed in extremely small amounts in presence of citrate. The interference of manganese which imparts a pinkish tinge need not be feared since this coloration is not stable and fades quickly. Iron does not react in an alkaline solution. If a considerable amount of iron is present, pyrophosphate

is recommended to prevent its coloration; this will reduce the coloration of Mn at the same time. The presence of 50 p. p. m. of each of Fe and Mn are permissible in as small amount of copper as 1 to 33 p. p. m.[5]. By shaking dithizonate with 0.01 N HCl, the greater part of Bi, Co, Ni, and Hg remains with the copper. But interference coming from Bi is practically not encountered owing to its scarity in biological materials, though of course there are exceptions to the case. *Sylvester* et al.[5] reported that 50 p. p. m. of Co and Ni are permissible with 0.2 to 2.7 p. p. m. of copper to be determined without expecting any interference from these elements. Evidently their interference is far from being questioned as their amounts in living plants are usually insignificant in relation to the copper content[16]. Though various cases have been considered, actual cases of interference by the use of this method are rare, owing to the weakness of color intensities imparted by other elements in contrast to the copper compound. This is shown in Table 1. $E\,\gamma$ stands for the extinction of the colored solution containing 1 γ in 1 ml of the element when a cell depth of 1 mm is used.

Table 1. Sensitivity of some elements to sodium diethyldithiocarbamate.

	Cu	Mn	Co	Ni	Bi	Zn	Pb	Fe	Ti
$E\,\gamma$	0.201	0.0000	0.0168	0.0081	0.0018	0.0040	0.0001	0.0007	0.001
Color reaction	golden yellow	pink (unstable)	dull green	greenish yellow	yellow (ppted)	white turbidity	white turbidity	deep brown (ppted)	yellowish white turbidity

C. Hydroxylamine in the Extraction.

The degree of coloration of the aqueous solution is strictly proportional to the amount of copper present, but not when extracted with some organic solvents. It is thought that the rate of transference of the colored matter into organic solvents is so small that complete transference is impossible. To overcome this defect *Haddock* and *Evers*[17] recommended that extraction be repeated until the solution becomes colorless. Yet the result of this process, as was said by many workers, is not in conformity with *Lambert-Beer*'s law.

Only *McFarlane*[8] reported conformity with the law when extracting with amylalcohol though the range of concentration in which proportinality is observed is somewhat narrow. *Nydahl*[9] added that about three hundred extractions would be required. But accurate results cannot be expected in this case. The addition of hydroxylamine, first tried by the authors,

during the process of extraction with carbon tetrachloride completely solves the difficulty of obtaining complete extraction of the colored compound of copper. Only 30 or more seconds are needed for complete extraction. By its addition in making the extraction with carbon tetrachloride it conforms accurately with the law and brings about the best results by a short shaking for 30 seconds. The addition of hydroxylamine was found useful in several cases when tested with solvents which had been proposed. Yet among them carbon tetrachloride is the most advantageous owing to its larger density, lower solubility and lower vapor pressure which are properties convenient for practical use. Its addition in the noted quantities imparts no ill effect on the stability of coloration, and its advantage is seen in that there is no appreciable decrease noticed after three hours standing. But increasing the amount above that recommended will result in a slight decrease in the stability of coloration.

Table 2. Stability of the coloration in carbon tetrachloride.

	Extinction Coefficient						
Time (min.)	0	30	60	80	100	180	24 hrs.
10.05 γ Cu...	0.384	0.380	0.376	0.370	0.373	0.370	0.362
10.05 γ Cu...	0.452	0.436	0.414	—	0.409	0.404	0.401
20.10 γ Cu...	0.755	0.750	—	—	—	0.743	0.725

By testing various degrees of addition, 2 ml of 4% hydroxylamine was found advantageous in diminishing the pinkish coloration due to manganese.

The relation between p_H and the efficiency of extraction was next examined, whereupon p_H 7.2 to 10.5 was found most suitable. The smaller the p_H of the solution, the more repetition of the extracting process is necessary. The extraction must be done with great precautions so that the separated carbon tetrachloride is free from droplets of aqueous solution, otherwise, a futile oxidation will cause a certain cloudiness.

Table 3. Efficiency of extraction at various p_H (copper present 11.00 γ).

pH	3.0	6.7	7.2	8.6	9.7	10.5	10.9	11.5
Extinction coefficient..	0.430	0.440	0.457	0.451	0.454	0.464	0.434	0.414
Copper (found) (γ).	10.70	10.95	11.37	11.22	11.29	11.54	10.75	10.30

D. General Procedure.

Weigh 0.01 to 0.03 g ash into a dish and add 10 to 15 ml of hydrochloric acid (1 : 1). Maintain at constant temperature, being cautious not to over-heat, till the dish becomes dull red. Continue the heating until the solution is evaporated to dryness. Then add 5 ml of water to bring all soluble materials into solution by gentle heating and if necessary repeat this procedure.

Next add 5 ml of 10% sodium citrate solution and add drops of saturated ammonia until the solution becomes alkaline to litmus paper and continue to add an excess of 0.2 ml. If the solution becomes noticeably turbid on the addition of ammonia, it is well to let it stand for a while before beginning the filtration. Filter the solution through a small filter paper of medium texture; transfer any residue in the dish to the paper and wash three or four times with 1 ml portions of cold water containing a drop of ammonia and citrate solution. Transfer the filtered solution to a separatory funnel, add 5 ml of 0.01% dithizone in carbon tetrachloride solution and shake for 0.5 minute after adding 3 ml of carbon tetrachloride, draw it off leaving a few drops of extractant to prevent transference of aqueous solution.

It is important that the separated carbon tetrachloride be free from droplets of aqueous solution, as iron so introduced will oxidize the reagent and lead to difficulties in the determination. Continue the extraction in this manner until the last 5 ml of dithizone solution remains distinctly green after being shaken vigorously.

To separate copper, add 10 ml of 0.01 N hydrochloric acid to the combined extracts and shake vigorously one minute. If the carbon tetrachloride remains red on shaking and does not become greenish or purple, add sufficient dithizone solution to change the red to a bluish or purplish color thus recombining copper liberated on this treatment. Draw off the carbon tetrachloride layer into another separatory funnel and again shake vigorously for two minutes with 10 to 12 ml of 0.01 N hydrochloric acid. Run the carbon tetrachloride into a silica dish, discarding the aqueous solution in which zinc, lead and other metals may be present. Evaporate the solution on water bath to dryness, add 3 or 4 drops of nitric acid (1 : 1) to moisten the residue.

Then evaporate and ignite gently to destroy all organic matter. To the cold dish add 1 ml of hydrochloric acid (1 : 1) and by means of a glass rod rub over the interior of the dish so that all the cupric oxide will be dissolved. Add 10 ml of water, transfer into a separatory funnel and rinse thoroughly with some water. Make the solution alkaline with ammonia to litmus paper and add the excess of 0.2 ml of ammonia solution.

Next add 2 ml of 4% hydroxylamine solution and 10 ml of 0.1% sodium diethyldithiocarbamate solution in the order named. It becomes

instantly golden yellow due to the copper. Shake vigorously with 7 ml of carbon tetrachloride and draw it off into a 25 ml volumetric flask after leaving it to settle. Leave a few drops of the carbon tetrachloride to prevent mixing of the aqueous solution and rinse the stem of the funnel with 2 ml of carbon tetrachloride. In this extraction the stem should be perfectly dry. Then shake again in the same manner as before. Usually one repetition is sufficient to entirely extract the colored matter. Then fill to the mark with carbon tetrachloride and measure the extinction coefficient with *Pulfrich* photometer using S 43 filter (434 mμ). If the final volume is reduced to less than 25 ml, then less than 5 γ of copper can be determined with fair results.

E. Accuracy and Reproducibility.

As complete extraction can now be carried out with the addition of hydroxylamine, the sensitivity of the reagent has been greatly increased. To determine its adherence to *Beer*'s law, tests were conducted with standard solutions of copper and in each case found quite accurate. We have here therefore a speedy and simple method of color comparison, with results showing a rangs of error within 5% more or less.

Table 4. Accuracy and conformability to the law.

Copper (present) γ	Accuracy: Extinction coefficient (50 mm thickness)	Accuracy: Copper (found) γ	Diff.	Conformability: Extinction coefficient (average)	Conformability: E γ (calculated)
2.01	0.081	2.02	+ 0.01	0.081	0.203
	0.197	4.90	— 0.13		
5.03	0.193	4.80	— 0.23		
	0.208	5.17	+ 0.14	0.201	0.201
	0.191	4.75	— 0.28		
	0.215	5.35	+ 0.32		
10.05	0.392	9.83	— 0.22		
	0.396	9.95	— 0.10		
	0.386	9.60	— 0.45	0.401	0.201
	0.401	9.98	— 0.07		
	0.408	10.14	+ 0.09		
	0.422	10.50	+ 0.45		
20.10	0.820	20.40	+ 0.30		
	0.800	19.90	— 0.20	0.801	0.203

As shown by tests for separation and extraction with dithizone, made with some biological materials (Table 5), this new method is proved most satisfactory, accurate and simple.

Table 5. Reproducibility.

Sample	Weight g	E	Copper (found) γ	%
Spinach ash.....	1.0037	0.320*	7.99	0.0080
	—	0.321	7.96	0.0079
Brudock ash	0.9521	0.698**	59.22	0.0608
	—	0.693	57.46	0.0603
Bone dust ash	0.8232	0.245	6.11	0.0074
	—	0.257	6.39	0.0078

* Extinction coefficient when the cell of 50 mm thickness was used (final volume 25 ml).

** Extinction coefficient when the cell of 30 mm thickness was used (final volume 50 ml).

F. Copper Content in Some Biological Materials.

To give examples of application of this method in determining copper in biological materials, several tests were performed. In all cases, the tests served in proving the superiority of the new method. This success is due to the adoption of dithizone as a preliminary separation method and to the addition of hydroxylamine for complete extraction of copper.

Table 6. Determination of copper in biological materials.

Sample	Ash %	Ash taken g	E (50 mm)	Cu found (γ)	Cu in ash %	Remarks
Rice (Japanese) .	0.78	0.0328	0.634	1.58	0.0048	Saitama Pref. 1943, uncleaned, 2nd grade
Rice (Burmese) ..	0.84	0.0444	0.426	10.60	0.0024	Basein Dist. 1943
Spinach.....	16.99	0.1004	0.321	7.99	0.0080	Chiba Pref. March, 1943
Potato	1.93	0.0775	0.064	1.59	0.0021	Dehydrated, Saitama Pref., June, 1943
Carrot	5.97	0.0121	0.294	7.30	0.0061	Dehydrated, Saitama Pref., Autumn, 1943
Brudock	4.25	0.0952	0.693	58.34	0.0606	Dehydrated, Chiba Pref., Autumn, 1943
Soy bean	4.38	0.0915	0.190	4.73	0.0052	Manchuria
Cabbage	6.02	0.0674	1.083	26.94	0.0400	Dehydrated
Fish meal.....	15.43	0.1015	0.181	4.50	0.0045	
Bone dust	55.43	0.0823	0.251	6.25	0.0076	
Bone dust	57.87	0.0670	0.180	4.48	0.0066	

Summary.

The addition of hydroxylamine, proposed by the authors, has entirely removed all defects in the determination of copper with sodium diethyldithiocarbamate, pointed out by previous workers.

Its use has given satisfactory results superior to other methods in the following respects: a) speedy and complete extraction of copper diethyldithiocarbamate complex with carbon tetrachloride, and b) no ill effect on the stability of coloration, the effective period of the reagent being also remarkably increased, c) increase of accuracy in color comparison by complete extraction of the colored matter so that it conforms with *Lambert-Beer*'s law.

Zusammenfassung.

Die von den Verfassern vorgeschlagene Zugabe von Hydroxylamin beseitigt alle Schwierigkeiten bei der Kupferbestimmung mit Diäthyldithiocarbamat, wie sie von anderen Autoren angegeben werden. Seine Verwendung bietet gegenüber anderen Verfahren verbesserte Ergebnisse aus folgenden Gründen:

a) Infolge rascher und vollständiger Extraktion des gefärbten Kupferkomplexes mit Tetrachlorkohlenstoff;

b) die Stabilität der Färbung wird nicht beeinträchtigt und die Haltbarkeit des Reagens wird merklich erhöht;

c) die Genauigkeit des Farbvergleiches wird durch die vollständige Extraktion so weitgehend erhöht, daß das *Lambert-Beer*sche Gesetz Gültigkeit erhält.

Résumé.

L'addition d'hydroxylamine, proposée par les auteurs, a entièrement éliminé tous les défauts dans le dosage du cuivre par le diéthyldithiocarbamate de sodium, défauts mis en évidence par de précédents auteurs. Son emploi a donné des résultats satisfaisants, supérieurs à ceux des autres méthodes aux points de vue suivants:

a) extraction complète et rapide du complexe de diéthyldithiocarbamate de cuivre avec le tétrachlorure de carbone, et

b) pas d'effet nuisible sur la stabilité de la coloration, la conservation effective du réactif étant remarquablement accrue,

c) accroissement de la précision dans la comparaison des couleurs par extraction complète de la matière colorante de sorte que la loi de *Lambert-Beer* soit obéie.

Bibliography.

[1] *M. Delepine*, Bull. soc. chim. France (4) **3**, 653 (1908); C. r. acad. sci., Paris **146**, 981 (1908).

[2] *T. Callan* and *J. A. R. Henderson*, Analyst **54**, 650 (1929).

[3] *L. W. Conn*, *A. H. Johnson*, *H. A. Trebler* and *V. Karpenko*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **7**, 15 (1935). — *R. W. Thatcher*, J. Amer. Chem. Soc. **55**, 4524 (1933).

[4] *S. L. Tompsett*, Biochemic. J. **29**, 480 (1929).

[5] *N. D. Sylvester* and *L. H. Lampitt*, Analyst **60**, 377 (1935).

[6] *L. A. Haddock* and *N. Evers*, Analyst **57**, 178 (1932).

[7] *E. J. Coulson*, J. Assoc. Off. Agric. Chemists **20**, 178 (1937).

[8] *McFarlane*, Biochemic. J. **26**, 1022 (1932); Z. analyt. Chem. **101**, 71 (1935).

[9] *F. Nydahl*, Z. analyt. Chem. **116**, 315 (1939).

[10] *D. L. Drabkin*, J. Assoc. Off. Agric. Chemists **21**, 202 (1938). — *L. A. Haddock* and *N. Evers*, Analyst **57**, 495 (1932). — *O. B. Winter*, J. Assoc. Off. Agric. Chemists **19**, 359 (1936). — *E. J. Coulson*, J. Assoc. Off. Agric. Chemists **20**, 178 (1937).

[11] *D. L. Drabkin*, J. Assoc. Off. Agric. Chemists **22**, 320 (1939).

[12] *Irwin Stone*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **15**, 479 (1942). — *L. Gerbert* et al., loc. cit. **15**, 364 (1942).

[13] *E. B. Sandell*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **9**, 464 (1937).

[14] *L. W. Conn*, *A. H. Johnson*, *H. A. Trebler* and *V. Karprenko*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **7**, 15 (1935). — *R. W. Thatcher*, J. Amer. Chem. Soc. **55**, 4524 (1933).

[15] *T. Callan* and *J. A. R. Henderson*, loc. cit. — *J. H. Hamence*, Trans. Faraday Soc. **30**, 299 (1934).

[16] *F. Honcamp*, Handbuch der Pflanzenernährung und Düngerlehre, Bd. I, Leipzig, 1931, S. 261.

Statens institut för folkhälsan, Tomteboda, Schweden.

Erfahrungen über Mikrobestimmungen von Quecksilber und Blei in biologischem Material.

Von

Ragnar Vesterberg.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

Es scheint mir, als ob es von allgemeinem mikroanalytischem Interesse wäre, unsere Erfahrungen betreffs der Bestimmung von Quecksilber und Blei, die wir im Gewerbehygienischen Institut Schwedens gesammelt haben, hier vorzulegen.

Unsere Auffassung ist, daß große Schwierigkeiten bestehen, diese Metalle mit größter Genauigkeit (bis auf γ-Mengen) zu bestimmen; denn

1. ist es ein Problem, die Probenahme so durchzuführen, daß man nicht schon dabei Fehler verursacht, und

2. muß man bei der „Vorbehandlung" der Proben so verfahren, daß sie „mineralisiert" werden, ohne daß die betreffenden Metalle verlorengehen oder „eingemischt" werden. Außerdem: der Mineralisierungsprozeß muß schnell vor sich gehen;

3. soll die Bestimmungsmethode spezifisch sein, so daß sie auch bei Anwesenheit von anderen, eventuell „störenden" Metallen ausgeführt werden kann. Es ist sicher, daß eine große Reihe anderer Metalle normalerweise in biologischem Material anwesend sind, z. B. Zn, Cu, Mn, aber oft auch „anormale", wie Bi und Sb usw.

Alle diese Schwierigkeiten ganz ideal zu lösen, ist anscheinend unmöglich. Wir haben das Problem in folgender Weise zu klären versucht.

Die Gefahr einer Quecksilberaufnahme ist in verschiedenen Berufen immer noch groß. Natürlich hängt dies auch damit zusammen, daß Quecksilber Eigenschaften besitzt, die wissenschaftlich und technisch sehr wertvoll sind.

Die Quecksilberbestimmungsmethode wurde im Jahre 1945 bis 1946 ausgearbeitet und ist in englischer Sprache 1946 veröffentlicht[1].

Man kann die Analyse in eine „Vorbehandlung" und die eigentliche Bestimmung einteilen. Bei der Bestimmung verwenden wir „Dithizon". Seit 1946 haben wir im Laboratorium etwa 5500 Proben analysiert — hauptsächlich Harnproben.

Die Vorbehandlung von Hg-Proben.

Harnproben (gew. 500 ml)
(eventuell mit HCl konserviert)
↓
mit HCl ansäuern;
Erwärmung 40° C;
eine Stunde chlorieren.
↓
Alles Cl_2 wird abgetrieben;
15 Min. bei Zimmertemperatur chlorieren.

Blut und Organproben usw. (gew. 25 g)
↓
Die Probe wird unter Zusatz von HCl und $KClO_3$ während einiger Tage aufgeschlossen.

↓↓
Alles Cl_2 wird abgetrieben;
↓
5 mg Cd^{2+} werden zugesetzt;
p_H auf 5 bis 6 mit konz. NH_3 einstellen.
↓
Einleitung von H_2S während 30 Min.; die Probe bleibt über Nacht stehen.
↓
Die Probe wird durch Glasfiltertiegel (164) filtriert;
das Filter + die Fällung werden mit 5 ml konz. HCl + 0,75 g $KClO_3$ versetzt.
↓
Die Lösung wird durch dasselbe Filter filtriert und in ein Zentrifugenrohr aufgenommen.
↓
Die Lösung wird mit konz. NH_3 neutralisiert;
wird 15 Min. mit H_2S gefällt;
soll 2 Stunden stehen.
↓
10 Min. zentrifugieren; dekantieren;
mit Aq. redest. aufschlämmen;
10 Min. zentrifugieren; dekantieren.
↓
Die Fällung im Zentrifugenrohr wird mit 2 ml konz. HCl + 0,4 g $KClO_3$ versetzt;
2 Stunden auf Dampfbad;
alles Cl_2 austreiben.
↓
Quecksilber und Kupfer werden extrahiert.

Die vorbehandelte Probe wird mit CCl_4-Dithizonlösung in kleinen Portionen ausgeschüttelt.

Die ersten Extrakte (Hg + etwas Cu) gelb—orange	*Die späteren Extrakte* (Cu) violett—grün
↓	
CCl_4-Phase wird mit 7-n-H_2SO_4 geschüttelt	
↓	↓
CCl_4-Phase (Hg)	*H_2O-Phase* (ev. Cu)

wird mit Aq. redest. gewaschen;
Titration mit $AgNO_3$.

Vorstehende Übersicht zeigt die Vorbehandlung. Diese ist kompliziert. Es handelt sich ja um ein „flüchtiges Metall", das außerdem mit großen Mengen organischer Substanz vermischt ist. Es ist bei Quecksilber, nicht aber bei Blei möglich, das Metall mit H_2S quantitativ abzutrennen, da das Löslichkeitsprodukt günstig liegt. Das Abtreiben des Chlors bereitet indessen Schwierigkeiten; auch kann es sehr schwierig sein, fettreiche Substanzen aufzuschließen.

Bei der praktischen *Ausführung der Analysen* verwenden wir zum Austreiben des Chlors Dampfherde, die mit Deckeln aus Speckstein versehen sind. Die Wasserdampfbecken sind im Boden des Abzuges eingebaut. Ein guter Abzug ist notwendig, teils für die Ausführung der Analysen selbst, teils vom gewerbehygienischen Standpunkt (H_2S und Cl_2)*.

Nachdem die Vorbehandlung beendigt ist, schreitet man zum *Ausschütteln des Metalles.* (Siehe vorstehende Übersicht!) Diese Arbeiten müssen in einem abgetrennten Raum vorgenommen werden, am besten mit direktem Anschluß zum „Vorbehandlungsraum". Die Dithizonbehandlung wird auf einem mit mattiertem Milchglas belegten Tisch ausgeführt. Der Hintergrund muß rein weiß sein. Wir führen die letzte Bestimmung von Quecksilber mit Hilfe einer Titration mit Silbernitratlösung aus, was in der Routinearbeit genügend genau ist. Natürlich kann man auch mit einem Spektrophotometer arbeiten und genauere Messungen ausführen. Blindwerte aus den Reagenzien werden durch Doppelanalysen bestimmt, auch Kontrollwerte mit zugesetzten Mengen Quecksilberstandard werden anschließend ausgeführt.

* Die beim Vortrag gezeigten Lichtbilder unseres Laboratoriums können hier leider nicht wiedergegeben werden.

Die Bestimmung von *Blei* bietet ganz andere Schwierigkeiten. Hierbei kann man ohne weiteres bei der „Vorbehandlung" die stärksten Aufschließungsmittel anwenden, ohne dabei Verluste zu riskieren. Ein Problem ist hierbei, daß Blei viel mehr verbreitet ist als Quecksilber. Darum ist es auch fast unmöglich, ohne Blindwert aus den Reagenzien usw. auszukommen. Eine andere Sache ist, daß die Bleidithizonverbindung durchaus nicht so beständig ist wie die des Quecksilbers. Darum muß man andere konstant anwesende Metalle komplex binden, wodurch sehr viele zusätzliche Reagenzien verwendet werden müssen. Trotzdem gelingt es, Blei mit genügender Genauigkeit zu bestimmen. Außerdem kann man hier mit Vorteil Di-β-Naphthylthiocarbazon verwenden, wobei die größere Beständigkeit des mit Blei gebildeten Reaktionsproduktes ausgenützt werden kann. Es wird hier kurz die praktische Ausführung der *Bleimethode* geschildert. In Zusammenarbeit mit *Olof Sjöholm* wird über unsere Versuche bald eine ausführliche Veröffentlichung erscheinen[2]. Nachstehend das Schema der Vorbehandlung und Ausschüttelung:

Die Vorbehandlung von Pb-Proben.

Harnproben (gew. 200 ml) — *Blut und Organproben* usw. (gew. 25 g)

↓

Vakuumeinengung

↓

Mit 5 bis 10 ml HNO_3 versetzen;
Einengung fast zur Trockne.
(Die Behandlung wird eventuell wiederholt, bis die Lösung schwach gelb ist.)

↓

Mit 5 ml H_2O_2 versetzen;
Einengung fast zur Trockne.

↓

Mit 5 ml HCl + 0,2 g $KClO_3$ versetzen;
Einengung fast zur Trockne.

↓

Mit 5 ml H_2O_2 in Portionen versetzen, bis die Lösung fast farblos ist.

↓

Mit Hydroxylaminhydrochlorid versetzen und kochen.

↓

Mit Citrat versetzen und mit Aq. redest. auf 100 ml verdünnen.

Die vorbehandelte Probe wird in einen „Squibb"-Scheidetrichter übergeführt und mit konz. NH_3 alkalisch gemacht (Phenolrot). Hierauf wird Citrat-Cyanidlösung zugefügt und mit CCl_4-Dithizon ausgeschüttelt.

CCl_4-Phase (Pb, Bi, Sn, Tl)
(Rote Extrakte)
wird mit Acetatpuffer
geschüttelt (p_H 4,6)

H_2O-Phase (Cu usw.)

H_2O-Phase (Pb)
Nach Neutralisieren mit konz.
NH_3 wird Citrat-Cyanidlösung
zugefügt und mit CCl_4-Dithizon-
lösung extrahiert.

CCl_4-Phase (Bi, Sn, Tl)

CCl_4-Phase (Pb)
Nach Waschen mit sehr verdünntem
NH_3 wird aus der roten Lösung
Blei spektrophotometrisch bestimmt
(Wellenlänge = 515 mμ).

Die Dithizonmethode, über die ich hier kurz berichte, ist bei Routinearbeiten mit einer Genauigkeit von $\pm 5\%$ bei einer Probemenge von 200 ml Harn oder 25 ml Blut und einem Gehalt von 5 bis 100 γ Pb durchführbar. Bei der Di-β-Naphthylmethode: 0,1 γ bei einem Gehalt von 1 bis 20 γ. Die erste Methode ist genügend genau, wenn es sich um Bestimmungen von Blei in Harn und Blut in Routineanalysen handelt, wo die Normalwerte bei mehreren γ pro 1000 ml Harn bzw. 100 g Blut liegen. Die Di-β-Naphthylmethode haben wir in unserem Institut verwendet, um ein schwedisches Normalmaterial über Bleigehalte im Harn zu bekommen. Die Dithizonmethode wird als Routinemethode für Bleibestimmungen im Harn von Arbeitern, die „gefährdet" sind, verwendet.

Die Gesamtzahl der Analysen pro Jahr beläuft sich auf etwa 1000 bis 1200 Proben für jedes der beiden Metalle. Das genügt aber nicht für unsere Kontrolltätigkeit und darum planen wir jetzt eventuelle „Analysenfilialen" im Lande, die uns helfen können, die Routineanalysen auszuführen.

Zusammenfassung.

Über die im Schwedischen Gewerbehygienischen Institut ausgearbeiteten, bereits an anderer Stelle veröffentlichten Methoden zur Bestimmung von Blei und Quecksilber werden nach Durchführung von bisher mehr als 5500 Untersuchungen weitere Erfahrungen mitgeteilt. Für beide Methoden wurden besondere Mineralisierungsverfahren ausgearbeitet. Bei Bleianalysen in Lösungen wird vorher eine spezielle Vakuumeinengung vorgenommen. Die endgültige Bestimmung wird mit

Dithizon bzw. mit Naphthyldithizon ausgeführt. Schematische Übersichten des einzuhaltenden Arbeitsganges sind der Mitteilung beigegeben.

Summary.

The methods for the determination of lead and mercury worked out in the Swedish Industrial Hygienic Institute, and previously published elsewhere, have been the subject of more than 5500 studies. Special mineralizing procedures have been developed for both methods. A special vacuum concentration is applied previously when solutions are being examined for their lead content. The final determination is made with dithizone or naphthyldithizone. Schematic reviews of the procedural details to be maintained are given.

Résumé.

Par des méthodes déjà publiées ailleurs pour le dosage du plomb et du mercure sur des recherches effectuées à l'Institut suédois d'hygiène alimentaire, on indique l'exécution de plus de 5500 de ces dosages. Pour les deux méthodes, on a élaboré des procédés spéciaux de minéralisation; pour les analyses de plomb, on a fait auparavant une évaporation spéciale dans le vide. Le dosage définitif était effectué avec la dithizone ou avec la naphthyldithizone. A la communication, sont jointes des vues d'ensemble schématiques du mode opératoire requis.

Diskussion.

H. Prof. *M. Lipp* (Aachen, Deutschland): Wie wird das Schäumen des Harns beim Eindampfen im Vakuum verhindert?

H. *R. Vesterberg*: Durch Zusatz von Salpetersäure.

H. *F. X. Mayer* (Wien, Österreich): Welche Bleimengen, bzw. Quecksilbermengen werden in Ihrem Lande als Normalwerte bei bleifremden bzw. quecksilberfremden Arbeitern gefunden? Bei Blei zählen wir Werte bis zu 10 γ als normal, 10 bis 60 γ als zusätzliche Bleiaufnahme, über 60 γ als Bleischädigung.

H. *R. Vesterberg*: Zur Zeit ist in Schweden die Auffassung üblich, daß normalerweise weniger als 30 γ Blei pro 1000 ml ausgeschieden wird. Wir arbeiten derzeit daran, die „Normalwerte" für Männer in Schweden zu ermitteln. Bei Durchführung von Reihenanalysen nach unserer Methode ist normalerweise kein Quecksilber nachweisbar. Dessen Menge liegt also unter 3 γ pro 1000 ml. Oft kann man nach einer Zahnbehandlung (Silber- oder Kupferamalgame) etwa 20 bis 30 γ Hg/1000 ml Harn nachweisen. Bei quecksilberfremden Arbeitern ist aber normalerweise kein Quecksilber nachweisbar.

H. Prof. *H. Jansch* (Wien, Österreich): Im chemischen Laboratorium des Institutes für gerichtliche Medizin der Universität Wien verfahren wir bei Bleibestimmungen folgendermaßen: Das Blei wird in Gegenwart von Calcium bei essigsaurer Reaktion als Oxalat gefällt. Der Niederschlag wird in geprüften Porzellanschalen bei 550° verascht, mit 20%iger Salpetersäure aufgenommen und mit Dithizon ausgeschüttelt. Die photometrische Auswertung erfolgt nach einer Eichkurve.

Literatur.

[1] *Ragnar Vesterberg* und *O. Sjöholm*, Ark. Kemi, Mineral. Geol. 22A, Nr. 22, 1 (1946).

[2] *Ragnar Vesterberg* und *O. Sjöholm*, Mikrochem., im Druck.

Aus den Wissenschaftlich-analytischen Laboratorien der
F. Hoffmann-La Roche & Co. A. G., Basel.

Die Bestimmung der Vitamine als mikrochemische Aufgabe.

Von

H. Waldmann.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

Die Vitamine zeichnen sich aus durch sehr eindrückliche biologische Wirkungen, die diese Stoffe in erstaunlich geringen Mengen am avitaminotischen Organismus auszuüben vermögen. Dementsprechend sind die Konzentrationen, in denen man die Vitamine in tierischen oder pflanzlichen Organen und Säften antrifft, recht niedrig; es handelt sich da im allgemeinen um Größenordnungen, die man — in Anlehnung an den medizinischen Sprachgebrauch — in $mg\%$ = $^1/_{1000}\%$ (Verdünnung $1:10^3$) und in $\gamma\%$ = $^1/_{1\,000\,000}\%$ ($1:10^6$) angibt. Diesen Konzentrationsverhältnissen entsprechend darf man die Vitaminanalyse ohne weiteres als einen Zweig der Mikrochemie ansprechen und sie geradezu dem Sektor der Spurenanalyse zuordnen.

Am Anfang einer Vitamin-Entdeckungsgeschichte steht jeweilen die Bestimmung der biologischen Wirksamkeit, ausgetestet am avitaminotischen Tier. Mit dem Fortschreiten der chemischen Bearbeitung geht aber das Bestreben bald dahin, diese meist sehr langwierigen und kostspieligen Tierversuche durch einfachere und vor allem raschere Methoden zu ersetzen, das sind *chemische, physikochemische* und *mikrobiologische* Bestimmungsverfahren.

Die Tabellen (siehe Seite 974) geben eine Übersicht über die wichtigsten Vitamine und über die Prinzipien, nach denen sie chemisch, biologisch und mikro-biologisch bestimmt werden können. Weiter sind noch die mengenmäßigen Beziehungen zu den sog. biologischen Einheiten* angegeben, als internationale Einheiten (I. E.), soweit diese schon festgelegt sind. Die Zahlenangaben für verschiedene Vitamine sind nicht miteinander vergleichbar, da der Prüfungsmaßstab sowohl hinsichtlich

* Diese Einheiten haben heute nur noch historische Bedeutung.

Übersicht über die Vitaminbestimmungsmethoden.

I. Fettlösliche Vitamine.

Vitamine und biologische Einheiten	Chemische Methoden beruhend auf	Biologische Bestimmung am avitaminotischen Tier[43]	Klinisch verwendbare Verfahren
Vitamin A Axerophthol *1 I. E. = 0,30 γ Vitamin A-Alkohol* *0,344 γ Vitamin A-Acetat* β-Carotin als Provitamin *1 I. E. = 0,6 γ*	*U. V.-Absorption* („Eigenfarbe")[1] *Farbreaktion* mit $SbCl_3$ (*Carr-Price*)[2] mit Glycerin-Dichlorhydrin[3] Messung der *Eigenfarbe*[4]	Wachstumstest, Xerophthalmietest und Kolpokeratosetest (an der Ratte)	Bestimmung der Nachtblindheit (Hemeralopie)
Vitamin D Gruppe der antirachitischen Vitamine *1. I. E. = 0,025 γ D_2 oder D_3*	*Farbreaktion* mit $SbCl_3$ analog *Carr-Price*[5]	Rachitistest (Ratte) (Röntgenkontrolle der Knochenverkalkung)	Röntgenkontrolle des Verkalkungszustandes
Vitamin E α-, β- und γ-Tocopherol *1 I E. = 1000 γ d,l-α-Tocopherolacetat*	*Oxydimetrie* mit $AuCl_3$[6], $Ce(SO_4)_2$[7] und $FeCl_3$ + α, α'-Dipyridyl[8] *Farbreaktion* mit HNO_2[9] *Fluoreszenz* eines Phenazinfarbstoffes[10]	Abortverhütende Wirkung bei der trächtigen weiblichen Ratte	
Vitamin K *1 DAM-Eh. = 0,1 γ K_1* synthetische *K*-wirksame Substanzen *1 DAM-Eh. = 0,04 γ 2-Methyl-1,4-Naphthochinon*	*Farbreaktionen* mit Natriumalkoholat[11], bzw. Cyanessigester und Alkali[12] *Oxydimetrische Verfahren*[13] *Fluoreszenz* eines Phenazinfarbstoffes[14]	Bestimmung der Prothrombinzeit (Küken)	Bestimmung der Prothrombinzeit

Mikrobiologische Bestimmungsverfahren sind nicht bekannt.

II. Wasserlösliche Vitamine. a) Vitamin B-Komplex.

Vitamine und biologische Einheiten	Chemische Methoden beruhend auf	Mikrobiologische Methoden[42] Wachstumstest an	Biologische Auswertung am avitaminotischen Tier[43]
Vitamin B_1 Aneurin Thiamin *1 I. E. = 3 γ*	Thiochrom*fluoreszenz*[15] *Azofarb*reaktionen[16] *Enzymatische* Bestimmung für Aneurin und Cocarboxylase[17]	Phycomyces Blakesleeanus Hefe (Gärtest)	Bradycardietest (Ratte)[18] Polyneuritistest (Taube) Wachstumstest (Ratte)
Vitamin B_2 Lactoflavin Riboflavin SHERMAN-BOURQUIN-*Eh. = 20 γ*	*Eigenfarbe* (sichtbar und im Ultraviolett)[19] *Fluoreszenz* von Lactoflavin[20] oder Lumiflavin[21] *Polarographische Bestimmung*[22]	Lactobacillus casei (Milchsäurebildung)	Wachstumstest (Ratte, Küken)

Nicotylamid Niacin P. P. Faktor *Einheit unbekannt*	*Farbreaktionen* mit Bromcyan und Aminen[23], mit Dinitrochlorbenzol[24]	Lactobacillus arabinosus (Milchsäurebildung) (Bacterium proteus)	Heilung der „Black tongue"-Krankheit beim Hund
Vitamin B_6 Adermin Pyridoxin *1 Ratten-Eh. = zirka 7,5 γ*	*Farbreaktionen*: Phenoltest nach *Folin*[25], bzw. nach *Gibbs*[26] Azofarbstoffe[27] (Cyaninfarbstoff)[28]	Neurospora sitophila Hefe Streptobacterium plantarum	Wachstumstest (Ratte) Akrodynietest (Ratte)
Pantothensäure *1 Hühnchen-Eh. = 14 γ*	*Farbreaktion*: Fe‴-Salz der α, γ-Dioxy-β, β-dimethylbutyro-hydroxamsäure[29]	Lactobacillus arabinosus (Milchsäurebildung) Hefe	Wachstumstest (Ratte) Hühnerdermatitis
Folsäure *1 mikrobiol. Eh. = 0,02 γ*	*Azofarb*reaktion am p-Aminobenzoylglutaminsäurespaltstück[30]	Streptococcus lactis Streptococcus faecalis Lactobacillus casei	
Vitamin H Biotin Bios II *1 „Einheit" = 10 γ*	–	Hefe Milchsäurebakterien	Kurativer Test an Biotin-Mangel-Ratten, bzw. -Küken
Vitamin B_{12} Antiperniciosaprinzip *therapeutische Dosis 5—10 γ*	(Kobaltgehalt) (Absorptionsspektrum)	Lactobacillus lactis	*Klinische Auswertung*: Erzeugung der Reticulocytenkrise beim Patienten mit perniciöser Anaemie

Klinische Anwendung: Gehaltsbestimmung der verschiedenen Vitamine in Blut oder Harn nach chemischen, mikrobiologischen oder biologischen Verfahren.

b) Vitamin C.

Vitamin und biologische Einheit	Chemische Methoden beruhend auf	Biologische Bestimmung am avitaminotischen Tier[43]	Klinisch verwendbare Verfahren
Vitamin C L-Ascorbinsäure *1 I. E. = 50 γ*	*Oxydimetrie*: Jod[31], Dichlorphenolindophenol[32], Methylenblau[33] *Kolorimetrie*: Dichlorphenolindophenol[34], Monophosphormolybdänwolframsäure[35], *Folins* Reagens[36], Dinitrophenylosazon[37] *Biochemische* Methode mit Ascorbinsäureoxydase[38]	Skorbuttest (Meerschweinchen)	Bestimmung des Vitamin C-Defizits im Sättigungstest[39] Intradermaltest mit Dichlorphenolindophenol[40] Bestimmungen in Blut und Harn[41]

Mikrobiologische Bestimmungsverfahren sind nicht bekannt.

Literaturhinweise siehe Seite 986.

Versuchsobjekt wie Ausfallserscheinung von Vitamin zu Vitamin ein anderer ist.

Die übliche Einteilung in fettlösliche und wasserlösliche Vitamine gibt auch den Rahmen für die Unterteilung nach analytischen Gesichtspunkten. Den vier fettlöslichen Vitaminen A, D, E und K fügen wir noch das am Schluß der Tabelle aufgeführte Vitamin C an zufolge gewisser, von den übrigen wasserlöslichen Vitaminen abweichender Eigenschaften. Für diese Wirkstoffgruppe sind besonders sog. klinische Tests bekannt geworden, welche die betreffenden Vitaminmangelzustände an einem Patienten zu erkennen gestatten (Vitamin A: Nachtblindheit, in schweren Fällen Xerophthalmie; Vitamin D: mangelnde Verkalkung; Vitamin K: verlängerte Prothrombinzeit; Vitamin-C-Defizit). Dagegen kennt man für diese Vitamine keine mikrobiologischen Methoden. — Alle übrigen wasserlöslichen Vitamine faßt man unter der Bezeichnung „Vitamin-B-Komplex" zusammen; das ist insofern gerechtfertigt, als meistens mehrere dieser Wirkstoffe gemeinsam vorkommen, so vor allem in der Hefe und der Leber. Weiter ist bei einer Anzahl von ihnen ihre Funktion als Cofermente sichergestellt*. Im Rahmen der Erforschung des Bakterienstoffwechsels hat man auch erkannt, daß gerade diese B-Faktoren für Mikroorganismen lebensnotwendig sind, und daraus entwickelten sich die mikrobiologischen Bestimmungsmethoden, die eine wertvolle Bereicherung der Analysenmöglichkeiten ergeben haben.

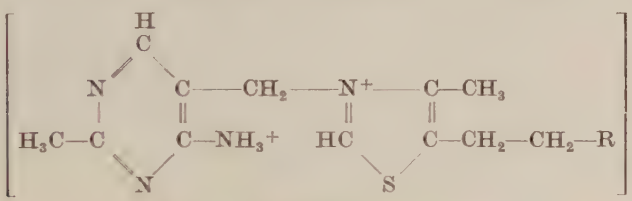
Den ursprünglichen *biologischen Auswertungen* sind die chemischen und physikochemischen Bestimmungsverfahren besonders hinsichtlich des Zeitbedarfes und der Reproduzierbarkeit weit überlegen, aber man erfaßt damit keine biologische Aktivität. Eine Mittelstellung zwischen chemischen und biologischen Bestimmungen nehmen die *mikrobiologischen Methoden* ein: mit diesen mißt man unter genau bekannten Kulturbedingungen an einem niedrig organisierten Lebewesen eine auffällige Lebensäußerung (z. B. Zellvermehrung, Gärung, Milchsäureproduktion) als Funktion einer gewissen Vitaminmenge, kurz eine biologische Aktivität.

Die mikrobiologischen Methoden haben noch andere in die Augen springende Vorteile: die Vitamin-Empfindlichkeit der Mikroorganismen ist außerordentlich groß (Größenordnung 0,001 bis 1 γ Vitamin pro ml Kulturlösung), viel größer als die der chemischen Reaktionen. Die vorbereitenden Handlungen sind im allgemeinen sehr einfach, da meistens Vitaminextrakte ohne besondere Reinigung eingesetzt werden

* In Cofermenten sind nachgewiesen worden: Aneurin als Cocarboxylase, Lactoflavin als Flavin-Adenin-Dinucleotid in mehreren „gelben" Oxydationsfermenten, Adermin in Aminosäuredecarboxylase, Nicotinsäureamid als Bestandteil der Codehydrasen, Pantothensäure im acetylierenden Ferment.

können: vor allem stören gefärbte oder trübe Lösungen selten. Die Kulturbedingungen sind meistens derart, daß sich verschiedene anwesende Vitamine gegenseitig nicht oder nur wenig beeinträchtigen. Verglichen mit den Anforderungen der chemischen Methoden ist der Aufwand an Apparaten und Chemikalien relativ gering. Dagegen braucht die Auswertung immer eine beträchtliche Zeit, da man den als Maßstab ausgewählten Lebensvorgang sich mehrere Tage lang entwickeln lassen muß, damit er gegenüber der Leerwertsbestimmung eine einwandfrei meßbare Größe erreicht. Zudem darf nicht unbeachtet bleiben, daß gewisse Mikroorganismen auch auf Bruchstücke eines Vitaminmoleküls ansprechen, den Wirkstoff also selbst zusammenzusetzen oder sogar teilweise zu synthetisieren vermögen. Vor allem brauchen aber die lebenden Kulturen eine dauernde Pflege und Kontrolle, damit sie auch bei längerer Züchtung unverändert wirksam bleiben.

Als Übergang von den chemischen zu den mikrobiologischen Bestimmungsverfahren können noch die *enzymatischen oder biochemischen Methoden* genannt werden. Als interessantes Beispiel dieser Art erwähne ich die enzymatische Bestimmung von Aneurin und Cocarb-



R = —OH: Aneurin
R = —$P_2O_7H_3$: Cocarboxylase

oxylase nebeneinander[1]: Die Methode beruht auf der Decarboxylierung von Brenztraubensäure durch alkalisch gewaschene Hefe bei Gegenwart von Aneurin plus Cocarboxylase. Ist letztere im Überschuß zugegen, so ist der Reaktionsablauf nur von der Aneurinmenge als begrenzendem Faktor abhängig oder umgekehrt bei Überschuß von Aneurin nur von der Cocarboxylasemenge. Im Carlsberg-Laboratorium, Kopenhagen, ist auf diesem Reaktionsprinzip unter Anwendung des Cartesianischen Tauchers ein Mikroverfahren ausgearbeitet worden, das noch 10^{-3} bis 10^{-4} γ Aneurin oder Cocarboxylase zu erfassen gestattet.

Bei der Fülle des Stoffes können im Rahmen dieser Mitteilung nur die Arbeitsprinzipien der *chemischen und physikochemischen Methoden* näher besprochen werden, wozu auch nur wenige typische Beispiele herangezogen werden können.

Unter den chemischen und physikochemischen Bestimmungsverfahren stehen *kolorimetrische Messungen* an erster Stelle; entweder

handelt es sich um die Messung der Eigenfarbe im sichtbaren Licht (Carotin, Lactoflavin) bzw. im ultravioletten Bereich (Vitamin A, Lactoflavin) oder um die Erzeugung von Farbstoffen durch chemische Umsetzungen (Vitamine A, D, E, K; Aneurin, Adermin, Nicotylamid, Pantothensäure, Folsäure; Ascorbinsäure). Je nach den vorhandenen funktionellen Gruppen sind da ganz verschiedene Möglichkeiten gegeben. Weiter spielen *fluoreszierende Verbindungen* eine zunehmend wichtige Rolle (Vitamine E, K, Aneurin, Lactoflavin), dies besonders, weil hinsichtlich der Erfassungsgrenze die fluorometrischen Verfahren den kolorimetrischen weit überlegen sind. Aber auch *oxydimetrische und reduktometrische Methoden* verschiedener Art werden angewendet (Vitamine E, K, Lactoflavin und vor allem C).

In der Benützung so unspezifischer chemischer Eigenschaften, wie Oxydierbarkeit und Reduzierbarkeit, liegt die gefährlichste Klippe der chemischen Vitamin-Bestimmungsmethoden, nämlich die Gefahr, biologisch unwirksame Substanzen mit zu erfassen.

Die Aufgabe des Vitamin-Analytikers ist aber nicht erschöpft mit der Durchführung der genannten Bestimmungsmethoden; vielmehr ist das mikrochemische Kernproblem die Aufgabe, die zu bestimmenden Wirkstoffe, die ja größtenteils chemisch sehr reaktionsfähige Verbindungen sind, verlustlos von allem inaktiven Material abzutrennen, das sie meistens in überwältigender Menge begleitet. Diese Aufgabe ist ganz anders geartet als z. B. die spektroskopische Bestimmung von Metallspuren in einer Legierung; hier gibt der Meßvorgang auch automatisch die Trennung. Ganz anders in der Vitaminanalyse, wo die Isolierung des Vitamins präparativ durchgeführt werden muß unter Berücksichtigung der Eigenschaften des jeweiligen Substrates.

Der *Arbeitsplan* für eine quantitative Vitaminbestimmung präsentiert sich daher häufig als sehr kompliziert und mühsam. Er umfaßt im allgemeinen folgende Stufen:

1. Die Extraktion des Vitamins aus dem Substrat; daran anschließend

2. die Reinigung und Anreicherung des Wirkstoffes auf Grund der jeweiligen Möglichkeiten.

3. Die eigentliche Messung; sie zerfällt in folgende Teile:

a) Messung der in der Probe scheinbar vorhandenen Vitaminmenge,

b) die Blindwertsbestimmung zwecks Feststellung und Berücksichtigung störender Beimengungen. Die Blindprobe ist stets mit Vorsicht auszuwerten, da bei dieser Bestimmung jeweils ein mehr oder weniger schwerer Eingriff in den normalen Reaktionsablauf vorgenommen werden muß,

c) der Zusatzversuch (eventuell Zusätze verschiedener Mengen des zu bestimmenden Vitamins) zur Eichung des eigentlichen Meßvorganges.

4. Die Berechnung des Vitamingehaltes unter Berücksichtigung aller Fraktionierungen.

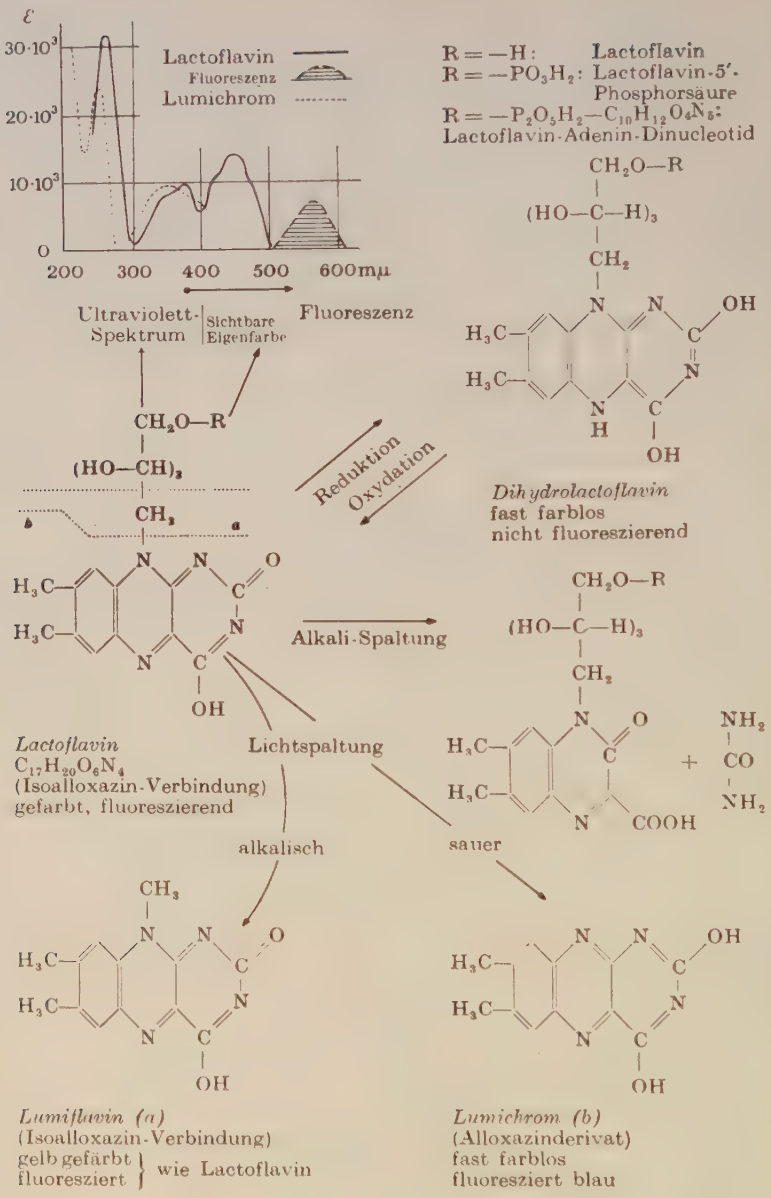
Zur Überprüfung des ganzen Aufarbeitungsverfahrens ist noch ein anderer Zusatzversuch wichtig: Gleich am Anfang wird dem Substrat eine bestimmte Vitaminmenge zugegeben und damit der quantitative Verlauf bzw. die Ausbeute des ganzen Analysenganges festgestellt.

Dieser Plan muß gegebenenfalls noch erweitert werden, wenn es sich darum handelt, Vitamine in verschiedenem Bindungszustand zu bestimmen, z. B. Dehydroascorbinsäure neben Ascorbinsäure (reduzierte Form); freies Nicotinsäureamid neben dem in Codehydrase gebundenen Anteil; Aneurin neben Cocarboxylase; Lactoflavin neben Lactoflavinphosphorsäure.

Einige Beispiele sollen hier veranschaulichen, in welcher Weise einzelne Probleme der Vitaminanalyse praktisch angepackt worden sind.

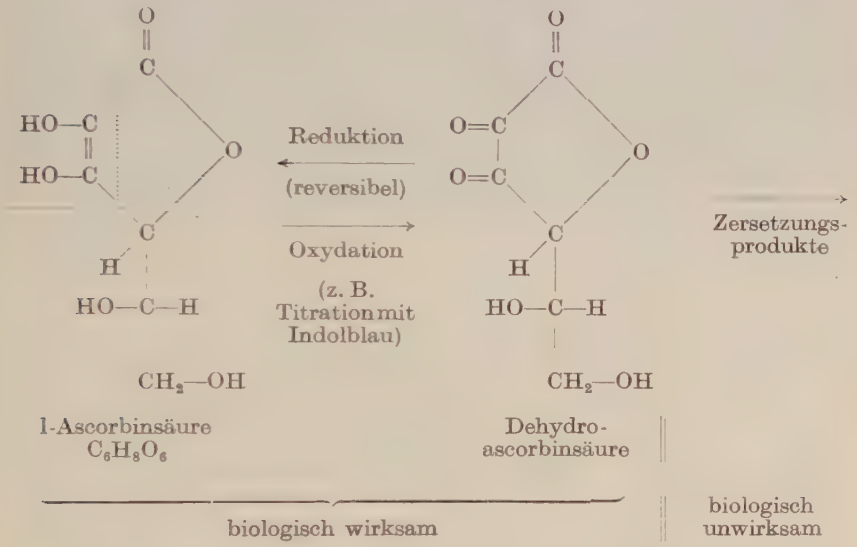
Am Lactoflavin soll gezeigt werden, wie sich aus den verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Verbindung mehrere Bestimmungsmöglichkeiten ergeben[2]:

Das *Lactoflavin* oder Vitamin B_2 kommt frei vor oder ist in der 5′-Stellung mit Phosphorsäure verestert; in dieser Form findet man es in der prosthetischen Gruppe mehrerer sog. „gelber" Oxydationsfermente (als *Warburg*sches „I. gelbes Atmungsferment", ferner in Xanthin- und Aminosäureoxydase als Flavin-Adenin-Dinucleotid). Fast unabhängig von seiner Bindung besitzt das Lactoflavin ein äußerst charakteristisches Absorptionsspektrum, das sowohl zu Messungen im Ultravioletten (366, 267, 220 mμ), wie im sichtbaren Licht[3] (446 mμ, $E^{1\%}_{1\,cm}$ 304) geeignet ist. Durch langwelliges Ultraviolett wird eine intensiv gelbgrüne Fluoreszenz erzeugt, die sich als breite Bande von 515 bis 615 mμ (mit Maximum bei 565 mμ) im Spektrum zeigt. Diese Fluoreszenz wird zur quantitativen Bestimmung geringster Mengen verwendet[4]. Das Vitamin ist ferner leicht reduzierbar; darauf ist ein polarographisches Verfahren aufgebaut worden[5]. Diese Eigenschaft kann aber auch benützt werden zur Erhöhung der Spezifität von kolorimetrischen und fluorometrischen Messungen, da das Dihydrolactoflavin nur noch $^1/_{10}$ der ursprünglichen Farbe und gar keine Fluoreszenz mehr aufweist; durch die Reduktion können Nebenfluoreszenzen und -färbungen in Form von Blindwertsbestimmungen der Messung zugänglich gemacht werden. Durch Licht wird die Zuckerkette des Lactoflavins abgespalten, und zwar je nach der Acidität auf zwei Arten: In alkalischer Lösung entsteht Lumiflavin[6], ein Iso-alloxazin-Derivat wie das Vitamin selbst, und daher in den physikalischen Eigenschaften, insbesondere in Farbe und Fluoreszenz dem Ausgangskörper sehr ähnlich. Ein wesentlicher und analytisch wertvoller Unterschied gegenüber dem Lactoflavin ist aber



seine Chloroformlöslichkeit, mit deren Hilfe wiederum unerwünschte Begleitstoffe abgetrennt werden können. Die Lichtspaltung in saurer Lösung führt zum Lumichrom, welches analytisch bedeutungslos ist. Säuren greifen dieses Vitamin nicht an; dagegen sind Alkalien bei der

Aufarbeitung zu vermeiden, da durch diese der Alloxanring aufgespalten wird. Gegen saure Oxydationsmittel ist Lactoflavin weitgehend beständig; dies wird häufig benützt zur Reinigung von Extrakten. Dem gleichen Zweck macht man die leichte Adsorbierbarkeit an Kohle, Bleisulfid, Fullererde oder Aluminiumoxyd dienstbar; zur Elution verwendet man pyridinhaltige Lösungen (*Emmerie*[3]). Eine gewisse Löslichkeit des Lactoflavins in Benzylalkohol schafft die Grundlage zu einer Trennung des Wirkstoffes von seinem 5′-Phosphorsäureester[7].



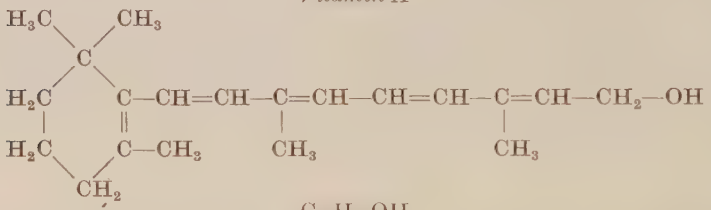
Die *Ascorbinsäure* — chemisch den Zuckern nahestehend — zeichnet sich durch ihre auf der Endiol-Gruppierung beruhende, außerordentlich kräftige Reduktionswirkung aus. Alle Bestimmungsverfahren hängen irgendwie mit der leichten Oxydierbarkeit der Ascorbinsäure, oder — damit gekoppelt — der Reaktionsfähigkeit der biologisch ebenso wirksamen Dehydroascorbinsäure zusammen. Man hat daher nach ganz speziellen Reagenzien und Reaktionsbedingungen suchen müssen, um auf diesem Wege eine gewisse Spezifität zu erreichen. Die wichtigsten Reagenzien sind: 2,6-Dichlorphenolindophenol (Indolblau), Methylenblau, Phosphormolybdänwolframsäure, *Folins* Reagens, Ascorbinsäureoxydase und 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Von diesen haben nur das erste und letzte wirkliche Bedeutung erlangt.

Die *Dichlorphenolindophenolmethode* ist vielseitig abgewandelt worden: Als Titration[8] unter bestimmten Aciditätsbedingungen, teils mit Endpunktsanzeige durch die Titrationslösung selbst, teils durch Aus-

schütteln des in Äther löslichen überschüssigen Farbstoffes. Auch die elektrometrische Endpunktsanzeige mittels einer amalgamierten Pt-Elektrode wird benützt. Das ist besonders wertvoll bei stark gefärbten und trüben Lösungen. Für die *kolorimetrische Bestimmung*[9] setzt man die Farbstofflösung im Überschuß zu, dann extrahiert man entweder den nicht reduzierten Farbstoff sofort mit Xylol und kolorimetriert diesen Extrakt, oder man verfolgt das Ausmaß der Reduktion der Farbstofflösung über eine gewisse Zeit und extrapoliert auf den Moment Null. Alle diese Bestimmungsarten haben zur Voraussetzung, daß Ascorbinsäure die am raschesten reduzierende Verbindung ist.

Im Blut beispielsweise, bestimmt man nach *Emmerie* und *van Eekelen*[8] die Gesamtascorbinsäure folgendermaßen: Frisch gewonnenes Oxalatblut wird mit dem gleichen Volumen 10% iger Trichloressigsäure enteiweißt und mit $^1/_2$ Vol. 20%iger Mercuriacetatlösung nachgefällt. Die überschüssige Trichloressigsäure muß so rasch als möglich durch

Vitamin A



$C_{20}H_{29}OH$

Zusatz von Calciumcarbonat neutralisiert werden, um ihre zersetzende Einwirkung auf die Ascorbinsäure zu vermeiden. In der durch Zentrifugieren geklärten Lösung fällt man durch Schwefelwasserstoff das überschüssige Quecksilber aus und reduziert gleichzeitig alle Dehydroascorbinsäure. Nach längerer Einwirkung des Schwefelwasserstoffes (etwa über Nacht) wird dessen Überschuß durch Kohlendioxyd oder reinen Stickstoff restlos ausgespült, dann titriert man mit eingestellter, z. B. n/1000-Indolblaulösung. Der Endpunkt ist erreicht, wenn die Indolblaufarbe mindestens 5 Sek. lang bestehen bleibt. Bis zum Einleiten von Schwefelwasserstoff muß möglichst rasch gearbeitet werden, um keine Ascorbinsäure durch irreversible Oxydation zu verlieren.

Beim anderen Verfahren oxydiert man alle Ascorbinsäure zur Dehydroform, setzt diese mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin um und bestimmt in Gegenwart von konz. Schwefelsäure das 2,4-Dinitrophenylosazon kolorimetrisch[10]

Die zahllosen Varianten dieser Verfahren zeigen, daß keine dieser Methoden restlos befriedigt; trotzdem haben sie in der Praxis der Vitamin C-Forschung Beachtliches geleistet (s. die Abschnitte über Vitamin C in den einschlägigen Handbüchern[11]).

Vitamin A konnte lange Zeit nur durch die biologische Auswertung (Wachstums- und Xerophthalmietest) bestimmt werden; die Farbreaktion mittels Antimontrichlorid — unter dem Namen *Carr-Price*-Reaktion[12] bekannt geworden — erwies sich demgegenüber als wenig zuverlässig, da andere Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen ebenso reagieren. Heute, nachdem das Vitamin A und seine Ester in kristallisierter Form sowohl aus natürlichen Quellen, wie auch synthetisch gut zugänglich sind, und man ihre Eigenschaften genau kennt, ist es leicht möglich, das Vitamin zu isolieren und anzureichern. Dies geschieht mittels Chromatographie, die getrennt auf Vitamin A-Alkohol oder Vitamin A-Ester gerichtet sein kann *(P. B. Müller*[13]*)*. Für die Auswertung ist — neben der *Carr-Price*-Farbreaktion — die Methode der Wahl die Messung der U. V.-Absorption in Isopropanollösung bei 325 mμ, für deren Auswertung *Morton* und *Stubbs*[14] genaue Richtlinien ausgearbeitet haben.

Die Vitaminanalyse spielt in der *pharmazeutischen Chemie* eine wichtige Rolle. Dabei werden die Vitamine nicht nur zur Behebung der bekannten Mangelzustände angewendet, sondern mit steigendem Erfolg auch für therapeutische Zwecke eingesetzt. Diese therapeutische Verwendung erfordert in der klinischen Praxis eine laufende Kontrolle des Vitaminspiegels einerseits und des Vitaminhaushaltes anderseits. Für die Ausführung solcher Bestimmungen an Kleinkindern oder an kleinen Laboratoriumstieren benötigt man Methoden, die auf den Einsatz kleinster Blut- oder Serummengen verfeinert worden sind. Dies ist bereits für einige Vitamine in befriedigender Weise gelungen. So gibt es für Ascorbinsäure eine titrimetrische Bestimmung mit Dichlorphenolindophenol in 0,1 ml Blut *(de Jong*[9]*)*, eine kolorimetrische Methode mit Dinitrophenylhydrazin in 0,03 ml (*Lowry* et al.[10]). Weiter kennt man für Vitamin A und Carotin ein spektroskopisches Verfahren, wozu nur 0,06 ml Serum benötigt werden (*Bessey* et al.[15]); auch für Lactoflavin ist ein fluorometrisches Verfahren mit 0,05 ml Serum beschrieben worden (*Burch* et al.[4]).

Das Gebiet der Zukunft aber ist die *Nahrungsmittelindustrie*, wo zur Zeit die endgültige Bedeutung der Vitamine noch nicht abgesehen werden kann. Gerade in der Nahrungsmittelindustrie ergeben sich alle die Schwierigkeiten der Präparation und anschließenden Bestimmung, die im Vorangehenden besprochen worden sind. Auf diesem heterogenen Arbeitsgebiet benötigt man nun ganz besonders Methoden, die einer möglichst allgemeinen Anwendung fähig sind, und man erwartet von ihnen, daß sie auch in verschiedenen Händen brauchbare, vor allem vergleichbare Resultate liefern. Das ergibt in gewissem Sinne konventionelle Methoden, die aber erfahrungsgemäß nicht immer befriedigen.

Die Nahrungsmittelindustrie ist auch dazu übergegangen, den Vitamingehalt gewisser Lebensmittel künstlich zu erhöhen, sie zu *vitaminieren*. Auf einzelnen Sektoren besteht da in manchen Ländern ein behördlicher Zwang; größtenteils erfolgen die Zusätze jedoch freiwillig seitens der Industrie. So hat sich also der Lebensmittelanalytiker sowohl mit dem natürlichen Vitamingehalt, wie mit vitaminierten Produkten und deren Deklaration auseinanderzusetzen.

Über die Art und das Ausmaß der Vitaminierung mögen folgende Angaben dienen: Am weitesten ist man auf diesem Gebiete in den Vereinigten Staaten von Amerika fortgeschritten, dann folgen etwa die nordeuropäischen Länder. Gesetzlich verankert ist die Vitaminierung der Margarine mit den Vitaminen A und D in den Vereinigten Staaten, Großbritannien, Holland, Dänemark, Schweden und Norwegen. Für Getreideprodukte (Mehle, Brot, Reis, Mais, „Cornflakes" usw.) kommt vor allem der Zusatz der B-Vitamine in Frage; Fruchtsäften, Limonaden und Fruchtkonserven setzt man in erster Linie Ascorbinsäure zu. Diätetische Produkte werden möglichst reichhaltig mit Vitaminen versehen. Auch vitaminreiche Futtermittel werden fabriziert, so besonders Legefutter für Geflügel.

In dieser Übersicht wurde versucht, einen Einblick in das weit verzweigte und schwierige Arbeitsgebiet der mikrochemischen Vitaminanalyse zu geben. Dabei konnten nur die wichtigsten analytischen Probleme und die damit zusammenhängenden praktischen Fragen gestreift werden. Die zitierten Arbeiten sollen den Weg zur umfangreichen Originalliteratur weisen, deren Kenntnis für eingehendere Untersuchungen unerläßlich ist.

Zusammenfassung.

An Hand einer tabellarischen Übersicht über die wichtigsten Vitamine werden die Möglichkeiten ihrer quantitativen Bestimmung mittels chemischer und physiko-chemischer Methoden erläutert, und diese den biologischen und mikrobiologischen Bestimmungsverfahren gegenübergestellt. Einzelne Beispiele sollen die mikrochemischen Grundprinzipien, Möglichkeiten und Schwierigkeiten der chemischen Vitaminanalyse beleuchten. Zum Schluß werden Aufgaben und Bedeutung der Vitaminbestimmungen in der pharmazeutischen Chemie und am Krankenbett einerseits, in der modernen Nahrungsmittelindustrie anderseits skizziert.

Summary.

A survey on the most important vitamins is presented, showing the possibilities for their quantitative estimation using chemical and physicochemical methods, and these in turn are compared with the biological and microbiological estimation methods. Some examples serve to demonstrate the microchemical basic principles, the possibilities, and difficulties of vitamin

analysis by chemical methods. Finally an outline has been made of the problems arising in vitamin assays and of their significance in pharmaceutical chemistry and clinical application as also in modern food industry.

Résumé.

Les possibilités de la détermination quantitative des principales vitamines au moyen de méthodes chimiques et physico-chimiques sont exposées dans un tableau qui contient également les procédés de détermination biologiques et microbiologiques. Quelques exemples illustrent les principes fondamentaux de l'analyse microchimique des vitamines, ses possibilités et ses difficultés. Pour terminer nous discutons les problèmes et l'importance de la détermination des vitamines pour la chimie pharmaceutique et son application clinique ainsi que pour l'industrie alimentaire moderne.

Literatur.

[1] *S. Ochoa* und *R. A. Peters*, Biochemic. J. **32**, 1501 (1938). — *H. G. K. Westenbrink*, Enzymologia **8**, 97 (1940); C. r. trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **23**, 195 (1940). — Siehe auch *H. Holter*, Mikrochem. **33**, 380 (1948).

[2] *H. Rudy*, Flavine. Fortschr. Chemie organ. Naturstoffe **2**, 61 (1939).

[3] *A. Emmerie*, Acta Brevia Neerlandica **6**, 136 (1936); Z. Vitaminforsch. **7**, 244 (1938). — *G. Lunde*, *H. Kringstad* und *A. Olsen*, Avhandl. utgitt Norske Videnskaps-Akad., Oslo, I. Mat.-Nat. Kl. 1938, Nr. 7.

[4] *S. H. Rubin*, *E. De Ritter*, *R. L. Schuman* und *J. C. Bauernfeind*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **17**, 136 (1945). — *H. B. Burch*, *O. A. Bessey* und *O. H. Lowry*, J. Biol. Chem. **175**, 457 (1948).

[5] *J. J. Lingane* und *O. L. Davis*, J. Biol. Chem. **137**, 567 (1941). — *R. Brdička*, Z. Elektrochem. **47**, 721 (1941); **48**, 686 (1942).

[6] *R. Kuhn*, *Th. Wagner-Jauregg* und *H. Kaltschmitt*, Ber. dtsch. chem. Ges. **67**, 1452 (1934).

[7] *A. Emmerie*, Rec. trav. chim. Pays-Bas **58**, 290 (1939). — Holl. Pat. 49039.

[8] *A. Emmerie* und *M. van Eekelen*, Biochemic. J. **28**, 1153 (1934); **30**, 25 (1936); Z. Vitaminforsch. **6**, 150 (1937). — *S. de Jong*, Acta Brevia Neerlandica **11**, 194 (1941). — *P. B. Müller*, Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. **36**, 189 (1945); **40**, 408 (1949).

[9] *E. Stotz*, J. Lab. Clin. Med. **26**, 1542 (1941). — *W. B. Robinson* und *E. Stotz*, J. Biol. Chem. **160**, 217 (1945). — *O. A. Bessey*, J. Biol. Chem. **126**, 771 (1938).

[10] *J. H. Roe* und *C. A. Kuether*, J. Biol. Chem. **147**, 399 (1943). — *J. H. Roe* und *M. J. Oesterling*, J. Biol. Chem. **152**, 511 (1944). — *O. H. Lowry*, *J. A. Lopez* und *O. A. Bessey*, J. Biol. Chem. **160**, 609 (1945).

[11] *F. Gstirner*, Chemisch-physikalische Vitaminbestimmungsmethoden, 3. Aufl., F. Enke, Stuttgart 1941. — *The Association of Vitamin Chemists Inc.*, Methods of Vitamin Assay, Interscience Publ. Inc., New York, 1947. — *P. György*, Vitamin Methods, Vol. I, Academic Press Inc., New York, 1950.

[12] *O. Rosenheim* und *J. C. Drummond*, Biochemic J. **19**, 753 (1925). *F. H. Carr* und *E. A. Price*, Biochemic J. **20**, 497 (1926).

[13] *P. B. Müller*, Helv. Chim. Acta **27**, 443 (1944); **30**, 1172 (1947); Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. **40**, 359 (1949).

[14] *R. A. Morton* und *A. L. Stubbs*, Analyst **71**, 348 (1946); Biochemic. J. **41**, 525 (1947); **42**, 195 (1948).

[15] *O. A. Bessey*, *O. H. Lowry*, *M. J. Brock* und *J. A. Lopez*, J. Biol. Chem. **166**, 177 (1946).

Literatur zur Tabelle.

I. Übersichten und Handbücher.

A. *F. Gstirner*, Chemisch-physikalische Vitaminbestimmungsmethoden (1941, 3. Aufl., F. Enke, Stuttgart).

B. *H. R. Rosenberg*, Chemistry and Physiology of the Vitamins (1945, Revised Reprint, Interscience Publishers Inc., New York).

C. *The Association of Vitamin Chemists Inc.* (Edited by), Methods of Vitamin Assay (1947, Interscience Publishers Inc., New York).

D. *J. W. Dann* and *G. H. Satterfield*, Estimation of the Vitamins. Biological Symposia XII (1947, The Jaques Cattell Press, Lancaster, Pa.).

E. *P. György* (Editor), Vitamin Methods, Vol. I (1950, Academic Press Inc., New York).

II. Einzelpublikationen.

Vitamin A:

Generell siehe *R. A. Morton*, J. Pharm. Pharmacol. **2** 129 (1950).

[1] *P. B. Müller*, a) Helv. Chim. Acta **27**, 443 (1944); b) **30**, 1172 (1947); c) Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. **40**, 359 (1949). — *O. A. Bessey, O. H. Lowry, M. J. Brock* und *J. A. Lopez*, J. Biol. Chem. **166**, 177 (1946) (Mikromethode). — *R. A. Morton* und *A. L. Stubbs*, Analyst **71**, 348 (1946); Biochemic. J. **41**, 525 (1947) **42**, 195 (1948). — Minutes of the U. S. P. Open Conference on Vitamins, Washington D. C., Sept. 18, **1948**.

[2] *W. J. Dann* und *K. A. Evelyn*, Biochemic. J. **32**, 1008 (1938). — *B. L. Oser, D. Melnick* und *M. Pader*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **15**, 724 (1943). — *W. Brew* und *M. B. Scott*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **18**, 46 (1946). — *P. B. Müller*, siehe unter 1.

[3] *A. E. Sobel* und *H. Werbin*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **18**, 570 (1946); **19**, 107 (1947).

[4] *E. Bickoff* und *K. T. Williams*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **15**, 266 (1943). — *A. R. Kemmerer*, Assoc. Offic. Agr. Chemists **29**, 18 (1946). — *P. B. Müller*, siehe unter 1.

Vitamin D:

[5] *D. T. Ewing, G. V. Kingsley, R. A. Brown* und *A. D. Emmett*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **15**, 301 (1943). — *P. B. Müller*, siehe unter 1b, c.

Vitamin E:

[6] *P. Karrer, H. Keller* und Mitarbeiter, Helv. Chim. Acta **21**, 939 (1938) 1161; **22**, 253, 617 (1939).

[7] *M. Kofler*, Verh. Schweiz. Naturf. Ges. **1941**, 239.

[8] *A. Emmerie* und *Ch. Engel*, Rec. trav. chim. Pays-Bas **57**, 1351 (1938); **58**, 283, 895 (1939). — *A. Emmerie*, ebenda **61**, 305 (1942). — *G. G. Mayer* und *H. Sobotka*, J. Biol. Chem. **143**, 695 (1942).

[9] *M. Furter* und *R. E. Meyer*, Helv. Chim. Acta **22**, 240 (1939). — *J. R. Chipault, W. O. Lundberg* und *G. O. Burr*, Arch. Biochem. **8**, 321 (1945).

[10] *M. Kofler*, Helv. Chim. Acta **25**, 1469 (1942); **26**, 2166 (1943); **30**, 1053 (1947).

Vitamin K:

[11] *H. J. Almquist* und *A. A. Klose*, J. Amer. Chem. Soc. **61**, 1610, 1923 (1939). — *P. Karrer* und Mitarbeiter, Helv. Chim. Acta **22**, 310, 945, 1146 (1939). — *Kofler*, siehe unter 14.

[12] *I. L. Pinder* und *I. H. Singer*, Analyst **65**, 7 (1940).

[13] *Pinder* und *Singer*, siehe 12. — *N. R. Trenner* und *F. A. Bacher*, J. Biol. Chem. **137**, 745 (1941). — *J. V. Scudi* und *R. P. Buhs*, J. Biol. Chem. **141**, 451 (1941). — *J. Rosin, H. Rosenblum* und *R. Mack*, Amer. J. Pharm. **113**, 434 (1941). — *E. Schulek* und *P. Rózsa*, Mikrochem. **29** 178, (1941).

[14] *M. Kofler*, Helv. Chim. Acta **28**, 702 (1945).

Vitamin B_1:

[15] *D. J. Hennessy* und *L. R. Cerecedo*, J. Amer. Chem. Soc. **61**, 179 (1939). — *D. J. Hennessy*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **13**, 216 (1941). — *F. Wyss*, Helv. Physiol. Acta **1**, C 70. (1943). — *P. B. Müller*, Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. **40**, 387 (1949).

[16] *D. Melnick* und *H. Field* jr., J. Biol. Chem. **127**, 505, 515, 531 (1939); **130**, 97 (1939). — *M. Hochberg, D. Melnick* und *B. L. Oser*, Cereal Chem. **22**, 83 (1945).

[17] *S. Ochoa* und *R. A. Peters*, Biochemic. J. **32**, 1501 (1938). — *H. G. K. Westenbrink*, Enzymologia **8**, 97 (1940); C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim. **23**, 195 (1940); siehe auch Mikrochem. **33**, 380 (1948).

[18] *A. Liechti, A. v. Muralt* und *M. Reinert*, Helv. Physiol. Acta **1**, 79 (1943).

Vitamin B_2:

[19] *A. Emmerie*, Acta Brevia Neerlandica **6**, 136 (1936); Z. Vitaminforsch. **7**, 244 (1938). — *G. Lunde, H. Kringstad* und *A. Olsen*, Avhandl. utgitt Norske Videnskaps-Akad., Oslo, I. Mat.-Nat. Kl. **1938**, Nr. 7.

[20] *S. H. Rubin, E. de Ritter, R. L. Schuman* und *J. C. Bauernfeind*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **17**, 136 (1945). — *H. B. Burch, O. A. Bessey* und *O. H. Lowry*, J. Biol. Chem. **175**, 457 (1948) (Mikromethode).

[21] *R. Kuhn, T. Wagner-Jauregg* und *H. Kaltschmitt*, Ber. dtsch. chem. Ges. **67**, 1452 (1934). — *H. Roth*, Vorratspflege und Lebensmittelforsch. **4**, 34 (1941). — *P. B. Müller*, Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. **40**, 397 (1949).

[22] *J. J. Lingane* und *O. L. Davis*, J. Biol. Chem. **137**, 567 (1941). — *R. Brdička*, Z. Elektrochemie **47**, 721 (1941); **48**, 686 (1942).

Nicotylamid:

Generell siehe *Ph. Handler*, Internat. Z. Vitaminforsch. **19**, 393 (1947).

[23] *E. Kodicek*, Biochemic. J. **34**, 712, 724 (1940). — *Y. L. Wang* und *E. Kodicek*, Biochemic. J. **37**, 530 (1943). — *E. B. Brown, J. M. Thomas* und *A. F. Bina*, J. Biol. Chem. **162**, 221 (1946). — *P. B. Müller*, Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. **40**, 402 (1949).

[24] *P. Karrer* und *H. Keller*, Helv. Chim. Acta **21**, 463, 1170 (1938).

Vitamin B_6:

[25] *M. Swaminathan*, Nature **145**, 780 (1940). — *Kuhn* und *Löw*, siehe unter 28.

[26] *J. V. Scudi, H. F. Koones* und *J. C. Keresztesy*, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **43**, 118 (1940). — *O. D. Bird, J. M. Vandenbelt* und *A. D. Emmett*, J. Biol. Chem. **142**, 317 (1942).

[27] *A. F. Bina, J. M. Thomas* und *E. B. Brown*, J. Biol. Chem. **148**, 111 (1943).

[28] *R. Kuhn* und *I. Löw*, Ber. dtsch. chem. Ges. **72**, 1453 (1939).

Pantothensäure:

[29] *E. G. Wollish*, und *M. Schmall*, Analyt. Chemistry **22**, 1033 (1950).

Folsäure:

[30] *B. L. Hutchings* und Mitarbeiter, J. Biol. Chem. **168**, 705 (1947).

Vitamin C:

[31] *A. Szent-Györgyi*, Biochemic. J. **22**, 1387 (1928).

[32] *A. Emmerie* und *M. van Eekelen*, Biochemic. J. **28**, 1153 (1934); **30**, 25 (1936); Z. Vitaminforsch. **6**, 150 (1937). — *S. de Jong*, Acta Brevia Neerlandica **11**, 194 (1941) (Mikromethode). — *P. B. Müller*, Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. **36**, 189 (1945); **40**, 408 (1949).

[33] *E. Martini* und *A. Bonsignore*, Biochem. Z. **273**, 170 (1934).

[34] *O. A. Bessey*, J. Biol. Chem. **126**, 771 (1938) (Mikromethode). — *E. Stotz*, J. Lab. Clin. Med. **26**, 1542 (1941). — *W. B. Robinson* und *E. Stotz*, J. Biol. Chem. **160**, 217 (1945).

[35] *N. Bezssonoff* und *E. Stoerr*, Z. Vitaminforsch. **5**, 193 (1936).

[36] *A. Fujita* und *T. Ebihara*, Biochem. Z. **290**, 182 (1937).

[37] *J. H. Roe* und *C. A. Kuether*, J. Biol. Chem. **147**, 399 (1943). — *J. H. Roe* und *M. J. Oesterling*, J. Biol. Chem. **152**, 511 (1944). — *O. H. Lowry*, *J. A. Lopez* und *O. A. Bessey*, J. Biol. Chem. **160**, 609 (1945) (Mikromethode).

[38] *H. Tauber* und *I. S. Kleiner*, J. Biol. Chem. **110**, 559 (1935).

[39] *A. Jezler* und *W. Niederberger*, Klin. Wschr. **1936**, 710. — *V. Demole*, Bruxelles-Médical **32**, 1172 (1937). — *L. J. Harris* und *M. Abbasy*, Lancet **1937**, II, 1429.

[40] *H. Rotter*, Nature **139**, 717 (1937); Wien. klin. Wschr. **1938**, 205.

[41] Siehe die angeführten Handbücher, insbesondere *Gstirner* (A).

Mikrobiologische und biologische Bestimmungen:

[42] Neben den Handbüchern B, C, D und vor allem E vgl. auch *M. Welsch*, Le Dosage Microbiologique des Vitamines (1947, Masson, Paris).

[43] Neben den Handbüchern B und D vergleiche auch *K. H. Coward*, The Biological Standardisation of the Vitamins (2nd Edit., 1947, Baillière, Tindall & Cox, London).

Aus dem Neurohistologischen Laboratorium der Universitäts-Nervenklinik und dem Institut für Mikrochemie und Geochemie der Technischen Hochschule Graz.

Mikrochemische Untersuchungen über die topische Verteilung von Spurenelementen im Gehirn.

Von

H. Bertha, H. Malissa und F. Pohl.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 18. September 1950.)

Durch die Untersuchungen von *Spatz*[1] ergab sich die bemerkenswerte Tatsache, daß bestimmte Hirngebiete im Stammhirn einen erhöhten Eisengehalt aufweisen, der sich an dünnen Gehirnschnitten mit Hilfe chemischer Farbreaktionen (Berliner-Blau-Reaktion) sichtbar nachweisen läßt. Das Hirngewebe färbt sich bei dieser Behandlung diffus blau an, d. h. bei mikroskopischer Untersuchung zeigt sich nicht eine elektive Anfärbung der Zellelemente, sondern der Farbstoff erscheint gleichmäßig in dem angefärbten Hirngebiet verteilt.

Diese Gebiete sind im Stammhirn gelegen, der Globus pallidus, die Substantia nigra und der Nucleus ruber. Auffallend ist, daß die Intensität der Farbreaktion nicht überall gleich ist. *Diese Beobachtung gewinnt um so mehr an Interesse, als diese Gebiete auch funktionell zusammengehören*, und bei bestimmten Krankheiten *vorwiegend* befallen werden. Dieser Autor konnte weiters feststellen, daß sich bei der *progressiven Paralyse* Eisen mit denselben Methoden in der Hirnrinde vermehrt nachweisen läßt. Diese Feststellungen wurden der Ausgangspunkt unserer nachfolgenden Untersuchungen, zeigen sie doch, daß

1. der Eisengehalt des Gewebes im Gehirn nicht gleichmäßig verteilt ist, sondern daß bestimmte Gebiete Eisen vermehrt speichern, und daß

2. unter pathologischen Bedingungen Eisen in vermehrtem Maße auch in sonst eisenarmen Hirngebieten auftritt, so daß also anscheinend der Eisengehalt des Gewebes wechselnd auch durch pathologische Prozesse bedingt sein kann.

Dabei ist vorderhand die Frage noch nicht im Rahmen unserer Untersuchungen gelegen, an welchen Anionen oder organischen Gruppen das Kation gebunden ist. Diese Beobachtungen und die bekannte Tatsache, daß im menschlichen Körper folgende, in Tabelle 1 zusammengefaßten Spurenelemente eine mehr oder weniger bekannte Rolle spielen, ließen uns die Verteilung dieser Ionen interessant erscheinen.

Tabelle 1. Spurenelemente.

a	*b*	*c*
Mn	Li Si	Rb Ra Pb V
Cu J	B Ni F	Cs (La) (Au) Cr
Zn	Al Sn Br	Sr (Ce) Hg
Co	As Mb	Ba Se Ti

a) Spurenelemente mit bekannter Wirkung;
b) regelmäßig vorkommende Elemente, deren physiologische Wirkung im einzelnen nicht bekannt ist;
c) Anscheinend nicht lebensnotwendige Elemente (allfällige Durchgangsstoffe; nicht regelmäßig aufgefunden).

Wir haben uns daher die Aufgabe gestellt, systematisch nach Spurenelementen in anatomisch wohldefinierten Hirngebieten zu forschen. Es wurden untersucht:

a) bestimmte Gebiete der Hirnrinde, nach cytoarchitektonisch abgegrenzten Arealen;

b) die subkortikalen Gebiete des Stammhirnes;

c) das Kleinhirn.

Für die methodische Lösung dieser Fragestellung stand nach reiflicher Überlegung und tastenden Vorversuchen die spektroskopische Analyse in erster Linie zur Diskussion. Wenn überhaupt eine regionale Verteilung von Spurenelementen nachweisbar werden sollte, war dies nur an entsprechend kleinen Ausgangsmengen möglich, da nur auf diese Weise einzelne mikroskopisch begrenzte Hirngebiete erfaßt werden konnten. Daher kann nur die mikrochemische Untersuchung eine aussichtsreiche Aufschließung zugänglich machen. Da sich bei Anwendung der Tüpfelmethoden nach *F. Feigl*[2] herausstellte, daß mit der zur Verfügung gestellten Substanzmenge jeweils nur eine geringe Anzahl in relativ starker Konzentration vorliegender Elemente nachgewiesen werden kann, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt. Gewisse, bei solchen Versuchen gemachte Beobachtungen ließen uns aber vermuten, daß die Anzahl der Elemente, die im Gehirn zu finden sind, wesentlich größer sein dürfte, als man bisher angenommen hat, wobei sich gleich die Frage aufdrängte, ob im Gehirn nicht über die allgemein biologisch bekannten Elemente hinaus, solche besonderer, vielleicht spezifischer Art auftreten.

Als zur Untersuchung notwendige und ausreichende Substanzmengen erwiesen sich nach unseren bisher abgeschlossenen Versuchen 80 bis 120 mg fixiertes Hirnmaterial, da hierin wahrscheinlich fast alle noch vorhandenen Spurenelemente mikrochemisch mit Hilfe der Spektralanalyse erfaßt werden dürften.

Die Entnahme der oben geforderten Probemenge aus dem Gehirn wurde folgendermaßen vorgenommen:

Das Gehirn wurde bei der Sektion vorsichtig unter möglichster Vermeidung von Berührung in ein gereinigtes Porzellangefäß (große Abdampfschale) fallen gelassen, durch einen Medianschnitt durch die Mantelkante halbiert und die Hirnhaut mit Hornpinzetten abgezogen. Unter Vermeidung von Wasser wurde das so vorpräparierte Organ in 40% igem Formalin fixiert. Am dritten Tage wurde die eine Hälfte in zirka 0,5 bis 1 cm dicke Scheiben geschnitten, aus der anderen Hälfte Scheibchen von 1 cm Dicke aus der Hirnrinde, entsprechend der topischen Hirnkarte, entnommen. Aus diesen Hirnscheiben wurden mit einer Glaskanüle von 3 mm lichter Weite Hirnsubstanzzylinder von zirka 0,5 bis 1 cm Länge ausgestanzt und auf der Torsionswaage gewogen. Die so gewonnenen Zylinder wurden in der zur Fixierung verwendeten Formalinflüssigkeit in kleinen Röhrchen zur chemischen Untersuchung bereitgestellt und eine Formalinkontrolle mituntersucht.

Um die vorhandenen Spurenelemente spektroskopisch nachzuweisen, wurden die Hirnzylinder nach drei Methoden weiterbehandelt und das erhaltene Material abgefunkt, wobei sich die gleich zu schildernde dritte Methode als die zweckmäßigste erwies.

Methoden der Vorbehandlung.

1. Mit dem Rasiermesser wurde ein kleines Scheibchen abgezogen, mit je 3 bis 4 Tropfen konz. Salzsäure vermischt und das Teilchen mit geringem Lösungsanteil auf die Kohle gebracht.

2. Eine weitere Versuchsserie wurde nach der bekannten *Kjeldahl*-Aufschlußmethode, jedoch ohne Katalysator behandelt. Zu diesem Zwecke wurde das Hirnmaterial aus den Proberöhrchen mit Hilfe einer ausgeglühten Platinnadel entnommen, auf ein Filtrierpapier (S. u. S. 602) gelegt und getrocknet, das Gewicht der Hirnsubstanz mit Hilfe der Torsionswaage bestimmt und die so genommene Probe nunmehr in ein Schliffspitzröhrchen übergeführt und mit 1 ml konz., spektralanalytisch voruntersuchter Schwefelsäure versetzt. Mit Hilfe des *Gorbach*-Universal-Heizstativs[2] wurde während 18 Stunden auf 250 bis 300° C unter Zugabe von Wasserstoffperoxyd erhitzt bis eine klare Lösung vorlag, welche dann auf etwa 0,3 ml eingeengt wurde. Diese wurde dann der Spektralanalyse zugeführt. Da durch die Verwendung von Schwefelsäure und außerdem durch die vom Substanzgewicht abhängige Oxy-

dationsmittelmenge die Gefahr der Fremdioneneinschleppung gegeben war, wurde diese Methode wieder verlassen.

3. In den letzten Jahren wurde bekanntlich in immer steigendem Maße die Perchlorsäure zur Aufschließung organischen Materials herangezogen. Abgesehen davon, daß sich durch die Verwendung dieses Reagens die Zugabe von Wasserstoffperoxyd erübrigt, geht auch der Aufschluß, ebenfalls im Schliffspitzröhrchen durchgeführt, bedeutend rascher vor sich. Die oftmals zitierte Explosionsgefahr der Perchlorsäure bzw. der sich bildenden Perchlorate spielt hier eine wesentlich geringere Rolle als bei den makrochemischen Methoden, da 0,5 ml Perchlorsäure für Einwaagen bis zu 180 mg genügen.

Tabelle 2. Vorbehandlung nach Methode 1.

Nr.	Hirngebiet	gefundene Elemente
1	Globus pallidus: oral	Al Ca Fe K Mg Na P
2	Globus pallidus: caudal	Al Ca Cu Fe K Mg Na P
3	Thalamus	Al Ca Cu Fe K Mg Na P
4	Thalamus	Al Ca Fe K Mg Na P

Tabelle 3. Vorbehandlung nach Methode 2.

Nr.	Hirngebiet	gefundene Elemente
1	FA Stirnhirn: vordere Zentralwindung	Al Ca Cu Fe K Mg Na P Pb Si Sn Zn
2	FE Stirnhirnpol.....	Al Ca Cu Fe K Mg Na P Pb Si Sn Zn
3	Thalamus, Stammhirn	Al Ca Cu Fe K Mg Na P Si *Ag*
4	Subst. nigra, Mittelhirn	Al Ca Cu Fe K Mg Na P Si Sn
5	Cerebellum, Kleinhirn	Al Ca Cu Fe K Mg Na P Si Sn

Tabelle 4.

Nr.	Hirnregion	gefundene Elemente	mg Einwaage
1a	FA—FA γ	Al Ca Cu Fe K Mg Na P	39
1b	FA γ Bewegungszentrum.	Al Ca Cu Fe K Mg Na P *Si*	38
1c	FA	Al Ca Cu Fe K Mg Na P	40
3	FCB m Sprachzentrum .	Al Ca Cu Fe K Mg Na P *Si*	44
4	FD.....	Al Ca Cu Fe K Mg Na P *Be*	50
5a	FFa.....	Al Ca Cu Fe K Mg Na P *Si*	50
5b	FFa.....	Al Ca Cu Fe K Mg Na P	50
6	Pc Tastzentrum	Al Ca Cu Fe K Mg Na P	37
7	P Top	Al Ca Cu Fe K Mg Na P	76
9	Tc Hörzentrum.....	Al Ca Cu Fe K Mg Na P *Si Ti*	50
10	Nucleus amygdalae: Geruch	Al Ca Cu Fe K Mg Na P	44
12	Oc Sehzentrum	Al Ca Cu Fe K Mg Na P	50

Aus unserem bisher untersuchten Material geben wir hier eine schematische Aufstellung der in der Hirnsubstanz gefundenen Spuren-

Abb. 1.

Abb. 2.

elemente bekannt. Von vier untersuchten menschlichen Gehirnen wurden 60 Proben zur Vorbehandlung für die spektralanalytische Untersuchung entnommen.

Die Tabelle 4 zeigt das Ergebnis eines Perchlorsäure-Aufschlusses (Methode 3) von nach topischen Gesichtspunkten (Hirnschema nach *Economo)* entnommenen Hirnrindenzylindern (s. Abb. 1).

Tabelle 5 zeigt eine nach Methode 3 behandelte Versuchsreihe von in der Tiefe gelegenen Hirngebieten und vom Kleinhirn (s. Abb. 2).

Tabelle 5.

Nr.	Hirnregion	gefundene Elemente	mg Einwaage
1	Corpus callosum, Hirnmark	Al Ca Cu Fe K Mg Na P Si Sr	89
2	Thalamus, Stammhirn	Al Ca Cu Fe K Mg Na P	60
3	Nucleus ruber, Mittelhirn .	Al Ca Cu Fe K Mg Na P Si	80
4	Substantia nigra, Mittelhirn	Al Ca Cu Fe K Mg Na P	55
5	Cerebellum, Kleinhirn	Al Ca Cu Fe K Mg Na P	116

Die Verfasser möchten an dieser Stelle Herrn Prof. *G. Gorbach*, Vorstand des Institutes für Lebensmittelchemie und biochemische Technologie und Kurator des Institutes für Mikrochemie und Geochemie der Technischen Hochschule Graz, für seine Unterstützung und für sein Interesse herzlichst danken. Herrn Prof. Dr. *W. Holzer*, Vorstand der Univ. Nervenklinik Graz, danken wir für die Arbeitsmöglichkeit im Laboratorium der Klinik und Herrn Prof. Dr. *Th. Konschegg*, Vorstand des path.-anatomischen Institutes in Graz, für die Überlassung des Hirnmaterials.

Zusammenfassung.

Als bisheriges vorläufiges Ergebnis unserer Untersuchungen kann folgendes als bemerkenswert hervorgehoben werden:

1. Neben dem Vorkommen biologisch bekannter Elemente (K, Ca, Na, Mg, P) finden sich im Gehirn in allen unseren nach verschiedenen Vorbehandlungen aufgenommenen Spektrogrammen Al und Cu vor. Über die relativen und absoluten Verhältnisse dieses Vorkommens in einzelnen Hirngebieten haben wir noch kein Ergebnis.

2. In den untersuchten Hirngebieten scheinen die Elemente Pb, Zn (im *Kjeldahl*-Aufschluß), Si, Sn, Sr, Ag, Be und Ti auf. Von diesen Spuren ist Si am öftesten vertreten.

3. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von *Voinar* und *Rusanow*[1], die 1949 unabhängig von uns über das Vorkommen von bisher biologisch nicht beachteten Elementen im Gehirn wie Ag, Al, Bi, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Si, Sn, Zn, Ti und V berichteten.

4. Die Analyse von Spurenelementen im Gehirn läßt neue neurobiologische Gesichtspunkte erwarten.

5. Ob diese Spurenelemente funktionell von spezifischer Bedeutung für das Zentralnervensystem sind, ist vorderhand noch nicht abschließend zu beurteilen. Immerhin weist die Tatsache, daß es Spezial*zellen* in bestimmten Hirngebieten gibt, auf die Möglichkeit, daß auch Spezial*elemente* für bestimmte Funktionen eine Rolle spielen können.

Summary.

The present study has thus far yielded the following noteworthy results:

1) In addition to the occurrence of biologically known elements (K, Ca, Na, Mg, P), all of our spectrograms taken after various preliminary treatments, show the presence of Al and Cu in the brain. No information is available, as yet, concerning the relative and absolute amounts of this occurrence in the separate regions of the brain.

2) The elements Pb, Zn (in Kjeldahl decomposition) Si, Sn, Sr, Ag, Be, and Ti appear in the regions examined. Of these traces, Si appears most frequently.

3) These findings agree with these of *Voinar* and *Rusanow*, who, in 1949, independent of us, reported on the occurrence of previously biological unknown elements in the brain, such as Ag, Al, Bi, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Si, Zn, Ti, and V.

4) The determination of trace elements in the brain makes it likely that new neuro-biological viewpoints will arise.

5) At present, no definite conclusion can be reached as to whether these trace elements are functionally of specific significance for the central nervous system. After all, the existence of special *cells* in certain regions of the brain indicates the possibility that special *elements* may also play a role for certain functions.

Résumé.

On peut relever comme dignes de remarques les faits préalables suivants obtenus jusqu'ici au cours de nos recherches:

1 A côté des éléments connus biologiquement (K, Na, Ca, Mg, P), se trouvent, dans le cerveau, l'aluminium et le cuivre relevés sur nos spectrogrammes après divers traitements préalables. Nous n'avons pas encore de résultats sur les rapports absolus et relatifs de ces présences dans les régions particulières du cerveau.

2 Dans les régions expérimentées du cerveau, apparaissent Pb, Zn (dans l'attaque Kjeldahl), Si, Sn, Sr, Ag, Be et Ti. Parmi ces traces, le silicium se rencontre le plus souvent.

3 Ces résultats se recoupent avec ceux des expériences de *Voinar* et *Rusanow* qui, en 1949, indépendamment de nous, ont publié sur les éléments comme Ag, Al, Bi, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Si, Sn, Ti et V qui n'avaient pas été jusqu'alors biologiquement observés dans le cerveau.

4 L'analyse des traces dans le cerveau laisse prévoir de nouvelles considérations neurobiologiques.

5 Si ces traces ont fonctionnellement une importance spécifique pour le système nerveux central, on ne peut pas encore juger pour le moment, d'une façon concluante. Toujours est-il que les faits montrent dans des régions bien déterminées du cerveau des *cellules* spéciales avec la possibilité que des *éléments* spéciaux y jouent un rôle pour des fonctions déterminées.

Diskussion.

H. *F. X. Mayer* (Wien, Österreich): Wie verhält es sich mit dem Blutgehalt des Gehirnes? Waren die Gehirne ausgeblutet? Wurden Blindproben mit dem Fixierungsmittel gemacht?

H. *H. Bertha*: Der Blutgehalt des Gehirns ist zwar relativ groß, aber das Blut befindet sich nur in kapillaren Gefäßen. Die Gehirne waren nicht ausgeblutet. Blindproben mit dem als Fixierungsmittel verwendeten Formalin wurden gemacht.

H. *F. Lembeck* (Graz, Österreich): Kalium ist bekanntlich von besonderer Bedeutung bei der neuralen Transmission. Sind Ihnen quantitative Unterschiede des Kaliumgehaltes in verschiedenen Regionen des Zentralnervensystems bekannt?

H. *H. Bertha*: Bezüglich der mengenmäßigen Verteilung des Kaliums kann zur Zeit lediglich gesagt werden, daß die graue Substanz des Zentralnervensystems 320 bis 410 mg% und die weiße 340 mg% Kalium aufweisen. Somit steht Kalium unter den Kationen im Zentralnervensystem überhaupt an erster Stelle.

Literatur.

[1] *H. Spatz*, Z. ges. Neur. **77**, 261 (1922); Zbl. Path. **33**, 313 (1922).

[2] *F. Feigl*, Qualitative Analysis by Spot Tests. Elsevier Publishing Comp. New York—Amsterdam. 1947.

[3] *G. Gorbach*, Mikrochem. **33**, 385 (1944).

[4] *A. O. Voinar* und *A. K. Rusanow*, Chem. Abstr. **43**, 6719 h (1949).

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Jod in Mineralwässern.

Seine Bestimmung und Anreicherung.

Von

H. Ballczo und G. Mondl.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

Durchforscht man die Literatur nach einer brauchbaren Jodbestimmung, so erkennt man bald an der Unzahl von Literaturstellen[1], daß das Problem seiner Bestimmung als noch keineswegs gelöst betrachtet werden kann. Aber auch seine Anreicherung stößt auf Schwierigkeiten. Bis auf die Ausschüttelungsmethode nach Oxydation mit salpetriger Säure nach *H. Fresenius*[2] gibt es nur das Eindampfen unter Zusatz von Alkalicarbonat mit nachfolgender mehrfacher Extraktion mit Alkohol. Während bei der ersten Anreicherungsmethode die Genauigkeit wegen des *Nernst*schen Verteilungskoeffizienten für die Löslichkeit des Jods beeinträchtigt ist, hat man bei der zweiten eine sehr große Wassermenge aufzuarbeiten.

Ausgehend von der Tatsache, daß von einer Ionenvergesellschaftung immer jenes Ionenpaar ausgefällt wird, welches das kleinste Löslichkeitsprodukt aufweist, benützten wir die Grundgleichung:

$$AgBr + J' = AgJ + Br' \qquad (1)$$

zur Anreicherung von Jodionen. Dieser Vorgang stellt einen irreversiblen Ionenaustausch dar und beruht somit nicht auf dem Prinzip der durch das Massenwirkungsgesetz beherrschten gebräuchlichen Ionenaustauscher (Permutite), sondern ist als reine Fällung von der Konzentration in weiten Grenzen unabhängig.

Deshalb benannten wir diesen irreversiblen Vorgang auch kurz „Fällungsaustausch". Die quantitative Erfassung reicht bis zur Löslichkeit des Silberjodids; das entspricht etwa 1 γ Jodion im Liter. So konnten wir noch 1,7 γ Jod im Liter quantitativ erfassen (Tabelle 1).

Anreicherung.

Der Fällungsaustausch erfolgt auf einem auf Bimsstein niedergeschlagenen Fällungsaustauscher von Silberbromid (Abb. 1), welcher sich in einem kleinen Röhrchen von 5 mm Durchmesser und 40 mm Länge befindet. Zur Vermeidung des Kolloidwerdens des Austauschproduktes Silberjodid nach Gl. (1) wird der unterste Teil der Säule kurz, aber stark belichtet. Der obere Teil des Röhrchens wird außen mit einem lichtundurchlässigen Lack versehen, um das Silberbromid vor vorzeitiger Zersetzung zu schützen. Der Fällungsaustausch ist vom p_H der Probelösung weitestgehend unabhängig.

Abb. 1.

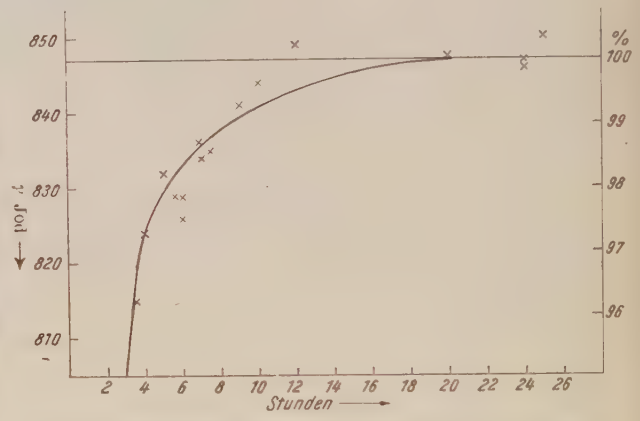


Abb. 2. Abhängigkeit der Oxydation mit Chlorwasser von der Zeit: J' (fest) + 3 Cl_2 + 3 H_2O = JO_3' + 6 HCl.

Bestimmung.

Zur Bestimmung wurde mit Vorteil das Multiplikationsverfahren nach *Winkler*[3] auch für das feste Silberjodid angewandt (Abb. 2). Nach Durchsatz der zu untersuchenden Lösung (wir benötigten kaum mehr als 2 l) wird der Fällungsaustauscher durchgestoßen und mit frisch bereitetem Chlorwasser im Laufe von 24 Stunden in der Kälte zu Jodat oxydiert. Die von *Kainrath*[4] verwendete Oxydation mittels Brom in mit Acetat gepufferter Lösung wurde in unserem Fall als ungeeignet erachtet, da bei den kleinen zu titrierenden Jodmengen der relativ große Salzgehalt stört und weil die zur Unschädlichmachung des Bromüberschusses verwendete Ameisensäure eine raschere Nachbläuung bei der Titration des in Freiheit gesetzten Jods mit Thiosulfat bewirkt. Bei der Verwendung von Chlorwasser als Oxydans benötigten

wir weder eine Pufferlösung, noch Ameisensäure, da sich der Überschuß an Chlorwasser ohne Schwierigkeit auf dem Wasserbad nach beendigter Oxydation beseitigen läßt. Es resultiert eine schwach salzsaure Lösung.

Tabelle 1. Mineralwasser-Analysen.

Bezeichnung, Herkunft	Quell-Charakter	γ J/kg Analyse	γ J/kg gefunden	Anmerkung
Sixtina-Quelle, Oberschützen	Hypoton. Natron-säuerling	415,6	405,2 409,3 407,4	vorher anges.
Emma-Quelle, Gleichenberg	Hypoton. Natron-säuerling	270,—	279,4 281,0 280,5	
Konstantin-Quelle, Gleichenberg	Hypoton. Natron-säuerling	400,—	385,6 387,1 387,3	
Preblau	Hypoton. Natron-säuerling	—	nicht nach-weisbar	2 Best.
Vöslauer Therme	Akratische Kalk-Therme	Spur	32,7 31,9	
Test	Dest. Wasser	0,16 0,75 1,70	0,0 nachweisbar! 2,2	

Tabelle 2. Titerstellung: Natriumthiosulfat 0,001-n (Doppeltitration, Stärkeempfindlichkeit).

a	b	a—b	$f_{20°}$	St. Empfindlichkeit ml $Na_2S_2O_3$/ml Lsg.	St. Empfindlichkeit γ J/ml	Anmerkung
10,000	4,985	5,015	0,9978	0,030 27	0,14	ohne Salicyl-säure
9,990	4,980	5,010		0,030/27	0,14	
10,228	5,105	5,123	0,9758	0,018/22	0,10	mit Salicylsäure
10,388	5,185	5,203	0,9618	0,017/21	0,10	
10,395	5,185	5,210		0,025/26	0,10	
10,400	5,189	5,211	0,9599	0,022 26	0,10	
10,395	5,187	5,208		0,021 26	0,10	
10,405	5,194	5,211	0,9599	0,016/21	0,10	
10,279	5,125	5,154	0,9740	0,029/27	0,10	
10,280	5,127	5,153	0,9740	0,026/26	0,10	

Eine Oxydation von Bromid zu Bromat (Restoxydation)[5] ist unter diesen Bedingungen einer in der Kälte verlaufenden Oxydation bei Anwesenheit von Salzsäure unmöglich, denn das Gleichgewicht:

$$Cl_2 + H_2O \rightleftarrows HCl + HOCl \qquad (2)$$

liegt praktisch auf der linken Seite. Bromid wird zu Bromat nur in der Siedehitze mit Hypochlorit in großem Überschuß oxydiert[6]. Das Oxydationspotential des Chlors allein genügt nicht zur Bromatbildung.

Um die kleinen Jodmengen maßanalytisch genau und sicher bestimmen zu können, verwendeten wir zur Titration des nach Ansäuern mit Zitronensäure[7] und Vorlegen einer Lösung von Kaliumjodid in Freiheit gesetzten Jods eine 0,001-n-Natriumthiosulfatlösung. Der Farbumschlag wurde durch Vergrößern der Durchsicht (Titration in der Eprouvette mit Kugelrührer) und unter Verwendung einer besonders empfindlichen und haltbaren Kaliumchlorid-Salicylsäure-Stärkelösung[8] kenntlich gemacht. Um den Titrationsfehler zu eliminieren, wurde die Doppeltitration angewandt und der Titer der 0,001-n-Thiosulfatlösung ebenso festgestellt[9]. Dabei ergab sich die gesteigerte Empfindlichkeit der Jodstärkereaktion mit etwa 0,1 γ Jod je Milliliter (Tabelle 2). Nach *Malissa*[10] beträgt die praktische Empfindlichkeit $Dp = 7$ (Makroeprouvette).

Die direkte Bestimmung durch Verdünnungsreihen konnte dies weitgehend bestätigen. Die Empfindlichkeit der Jodstärkereaktion wurde demnach gegenüber den von *Kolthoff* in seinem Buch „Die Maßanalyse" angegebenen Werten von 2,6 γ/ml auf das rund 25-fache gesteigert[11].

Wir versuchten auch direkte Jodtitrationen (ohne Doppeltitration nur mit Berücksichtigung des Jodstärkefehlers), jedoch mit ungleichem Erfolg; die Farbumschläge waren, wie wir erst später erkannten, stark von den mit der Tageszeit wechselnden Lichtverhältnissen abhängig (Tabelle 3).

Tabelle 3. Testwerte.

Verbrauch in ml			gefunden: γ Jod		Soll		Anmerkung
a	b	a—b	d	$d + k$	D	$x/3$	
0,395	0,196	0,199	24,90	25,50/6	25,26	25,38	vormittag
0,394	0,195	0,199	24,78	25,48/7	25,26	25,38	
0,396	0,198	0,198	25,14	25,63/5	25,14	25,38	
0,399	0,199	0,200	25,26	25,66/4	25,38	25,38	
0,406	0,205	0,201	26,01	26,61/6	25,50	25,38	nachmittag
0,407	0,203	0,204	25,77	26,47/7	25,89	25,38	
0,405	0,205	0,200	26,01	26,61/6	25,38	25,38	
0,407	0,205	0,202	26,01	26,71/7	25,63	25,38	
0,405	0,204	0,201	25,89	26,69/8	25,50	25,38	
0,403	0,203	0,200	25,77	26,47/7	25,38	25,38	

d ..... direkt aus b ermittelter Jodgehalt.
d | k .. korrigierter, aus b ermittelter Jodgehalt/Titrationsendvolumen.
D ..... durch Doppeltitration aus $a - b$ ermittelter Jodgehalt.

Der Fällungsaustausch kann mit Vorteil auch zur Reinigung von jodhaltigen Salzen Anwendung finden.

Arbeitstechnik.

A. *Herstellung des Fällungsaustauschers.* Um eine möglichst oberflächenaktive Silberbromidschicht zu erhalten, tränkten wir ausgeglühte Bimssteinstückchen mit konz. Silbernitratlösung bei Siedehitze; nach kurzer Wartezeit wurde die noch heiße Lösung mit konz. Kaliumbromidlösung gefällt, durch ein Faltenfilter filtriert, mehrmals mit dest. Wasser gewaschen und nicht getrocknet. Der so gewonnene Fällungsaustauscher wird feucht über Glaswolle in das Fällungsröhrchen gefüllt. Solcherart können die sonst störenden Luftblasen vermieden werden. Das Silberbromid-Bimsstein-Gemisch ist, im Dunkeln aufbewahrt, praktisch unbegrenzt haltbar.

B. *Der Fällungsaustausch.* Dieser erfolgt, wie bereits betont, in praktisch p_H-unabhängigem Medium. Vor Inbetriebnahme des gefüllten Fällungsröhrchens ist zu beachten, daß unter Umständen die ersten Anteile getrübt durchlaufen. Daher wird die Versuchslösung erst nach vorherigem Auswaschen mit Wasser bis zur völligen Klärung der abfließenden Waschflüssigkeit durchgesetzt. Die Durchlaufgeschwindigkeit beträgt 50 bis 60 Tropfen Min. oder 20 bis 30 ml 10 Min.

C. *Die Oxydation.* Diese verläuft mit frisch bereitetem, gesättigtem Chlorwasser nur sehr langsam (Abb. 2). Sie muß daher im geschlossenen *Erlenmeyer*-Schliffkölbchen 24 Stunden bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen bleiben. Zur Vertreibung des Chlorüberschusses erwärmt man etwa eine Stunde auf gut siedendem Wasserbad.

D. *Titration.* Um ein quantitatives Abtrennen der nun jodathaltigen Lösung von dem zurückbleibenden Fällungsaustauscher zu erreichen, saugt man mittels eines Porzellan- oder Glasfilterstäbchens die Lösung in den zur Titration verwendeten Meßkolben. Dadurch lassen sich Verluste, die bei Verwendung eines Papierfilters entstehen würden, leicht vermeiden. Auch das Auswaschen des zurückbleibenden Austauschers wird solcherart erleichtert. Die Titration wird in einer Eprouvette aus möglichst farblosem Glas ausgeführt. Ein Kugelrührstab, dessen oberes Ende zur besseren Beobachtung unter einem Winkel von 60° gebogen ist, dient zur ständigen Durchmischung der Titrationslösung. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, bedarf es einer Konzentration von 1 Tropfen 1%iger Kaliumchlorid-Salicylsäure-Stärkelösung je 2 ml der zu titrierenden Lösung, um einen optimalen Farbeffekt zu erreichen.

Die Titerstellung der 0,001-n-Thiosulfatlösung erfolgte mit Hilfe einer durch Verdünnung bereiteten 0,001-n-Kaliumjodatlösung durch Doppeltitration. Der Faktor wurde vor jeder Bestimmung neu ermittelt, da sein Wert durchschnittlich je Woche um 1% abnahm.

Tabelle 4. Abhängigkeit des Farbumschlages von der Stärkekonzentration.

Stärkekonzentration	3,8 γ Jod und 30 mg J′ in 10 ml	Anmerkung
Tr. 1% Lsg.	Farbe → Umschlag nach	
1 Tr. je 10 ml	Keine Blaufärbung	—
3 Tr. je 10 ml	Hellblau → farblos	titrierbar
5 Tr. je 10 ml	Blau → farblos	sehr gut titrierbar
10 Tr. je 10 ml	Blaulila → farblos	noch titrierbar
20 Tr. je 10 ml	Violett → gelb → farblos	schlecht titrierbar
35 Tr. je 10 ml	Braunviolett → braun → gelb	nicht titrierbar

Bereitung der 1%igen Kaliumchlorid-Salicylsäure-Stärkelösung: 70 ml Wasser werden mit 0,1 bis 0,2 g Salicylsäure p. a. versetzt und zum Sieden erhitzt. Nach Erkalten wird diese Lösung mit Kaliumchlorid p. a. gesättigt, was man am besten in einem Schliff-Meßzylinder bewerkstelligt. 1 g Amylum solubile p. a. werden in 20 ml Wasser durch Kochen (zirka 5 Min.) gelöst und mit 80 ml der gesättigten Kaliumchlorid-Salicylsäurelösung vereinigt. 24 Stunden stehen gelassen und wenn nötig filtriert. Eine solche Lösung zeigte auch nach vier Monaten trotz mehrmaligen Öffnens keine Zersetzung und Trübung.

Arbeitsvorschrift.

1 bis 2 l Wasser (je nach dem zu erwartenden Jodgehalt) werden durch eine 1 bis 2 g Silberbromid fassende Austauschersäule geschickt. Nach dem Durchwaschen mit dest. Wasser (es genügen 100 ml) wird der Austauscher in einem 100-ml-*Erlenmeyer*-Schliffkolben gestoßen und mit 20 bis 25 ml frischem, gesättigtem Chlorwasser 24 Stunden stehen gelassen. Danach wird der Schliffkolben geöffnet, eine Stunde auf ein siedendes Wasserbad gestellt und in einen 50-ml-Meßkolben übergesaugt. Zur Doppeltitration werden je 30 ml und 5 ml entnommen, die größere Menge vorher etwas eingeengt, in zwei farbgleiche Eprouvetten von gleichem Durchmesser gegeben und nach Titration der kleineren Menge auf das gleiche Endvolumen gebracht. Für ein Endvolumen von 25 bis 30 ml verwendeten wir 1 ml 5%iger Kaliumjodidlösung, 1,5 ml gesättigte Zitronensäurelösung, was einem Anfangs-p_H von etwa 2 entspricht. Nach 1 Min. Wartezeit wurde bis zur schwachen Gelbfärbung titriert, hernach 12 Tropfen unserer Stärkelösung zugegeben und auf farblos titriert.

Zusammenfassung.

Es wird eine neue Methode der Anreicherung von Jodionen aus ganz verdünnten Lösungen, besonders aber aus Mineralwässern durch Umsetzung mit Silberbromid beschrieben und der sog. „Fällungsaustausch" begrifflich dargelegt.

Die maßanalytische Bestimmung des Jods mit 0,001-n-Thiosulfatlösung wird durch Ausführung der Titration in der Eprouvette mit Kugelrührstab und Anwendung der Doppeltitration verfeinert. Dabei wurde die durch einen verbesserten Indikator vergrößerte Empfindlichkeit der Jodstärkereaktion bestimmt.

Summary.

A new method for collecting iodide ions from very diluted solutions, particularly mineral waters, by reaction with silver bromide is described. The so-called precipitation-exchange is presented abstractly.

The volumetric determination of iodine with 0.001 N thiosulfate solution is refined by carrying out the titration in the test tube with a spherical stirring rod and use of the double titration. The increased sensitivity of the iodine-starch reaction resulting from the use of an improved indicator was determined also.

Résumé.

On décrit une nouvelle méthode d'enrichissement des anions iode à partir des solutions très étendues, particulièrement des eaux minérales, par double échange avec le bromure d'argent et l'on expose sommairement le soit-disant «échange par précipitation».

Le dosage volumétrique de l'iode avec une solution 0,001 N de thiosulfate est amélioré en faisant le titrage dans l'éprouvette avec l'agitateur à boule et l'emploi du double titrage. La réaction iode-amidon est en outre déterminée avec une plus grande précision à l'aide d'un meilleur indicateur.

Literatur.

[1] *Th. Leipert*, Das Jod. Sammelreferat. Mikrochim. Acta **3**, 79 (1938).

[2] *H. Fresenius*, Z. angew. Chem. **25**, 1991 (1912).

[3] *L. W. Winkler*, Z. analyt. Chem. **39**, 81 (1900); Z. angew. Chem. **28**, 495 (1915).

[4] *P. Kainrath*, Z. analyt. Chem. **125**, 1 (1943).

[5] *Th. Leipert*, a. a. O. S. 88.

[6] *Th. Leipert*, Das Brom. Sammelreferat. Mikrochim. Acta **3**, 147 (1938).

[7] *F. Reimers*, Z. analyt. Chem. **118**, 399 (1940).

[8] *R. F. Milton* & *W. A. Waters*. Methods of quant. Microanalysis, Edward Arnold & Co., London, 1949, S. 198. — *E. Schulek*, Analyt. Chim. Acta **2**, 74 (1948).

[9] *H. Ballczo* und *J. Sinabell*, Mikrochem. **34**, 404 ff. (1949).

[10] *H. Malissa*, Analyt. Chim. Acta **4**, 1 (1950).

[11] *I. M. Kolthoff*, Pharmac. Weekbl. **55**, 156 (1919).

Laboratoire de Chimie biologique à l'Institut Pasteur, Paris.

Sur une méthode de microdosage des métaux alcalins applicable aux milieux d'origine biologique.

Par

Gabriel Bertrand et Didier Bertrand.

Avec 10 figures.

(Reçu le 18 juillet 1950.)

S'il existe de très bonnes méthodes de dosage du potassium et du sodium, il n'en n'est plus de même quand il s'agit de doser de très petites quantités de lithium, rubidium et césium. Depuis la découverte de *Bunsen* et *Kirchhoff*[1] et la mise au point de la méthode de recherche de traces d'alcalins par *Grandeau*[2], il n'avait été fait que peu de progrès. *E. Wilke-Dörfurt*[3], dans le cas très particulier du dosage du rubidium dans du KCl, a établi une méthode spectrographique, dont la limite inférieure de sensibilité de 200 γ est beaucoup trop élevée pour le cas qui nous occupe. *W. O. Robinson*[4], pour la détermination du Rb et du Cs dans les plantes, étudie une méthode mixte, chimique et spectrographique, qui, si elle semble suffisamment sensible, n'est que semi-quantitative. *Freundler*[5], pour pouvoir doser le Rb dans une Laminaire où il pensait avoir décelé ce métal, emploie une méthode chimique qu'il met au point. Sa technique est basée sur l'emploi de l'acide silicotungstique, antérieurement préconisé par *Godeffroy*[6]. Malheureusement cette méthode assez longue, ne permet pas de trouver moins de $^1/_{100}$ de RbCl dans un mélange de KCl, NaCl. *R. Bossuet*[7], pour des dosages de traces d'alcalins dans des minéraux, met au point le principe de la méthode spectrographique indiquée par *Gramont*[8], en la précédant d'une séparation chimique suivant la technique de *Carnot*[9]. Les sensibilités limites: 0,5 mg pour le Li; 0,03 mg pour le Na; 0,015 mg pour le K; 0,015 mg pour le Rb et 0,03 mg pour le Cs, si elles sont plus que suffisantes pour le K et Na, sont beaucoup trop élevées pour des recherches dans des matériaux d'origine biologique. Il en est de même pour la méthode spectrographique de *Lundegardh*[10], où elles sont encore plus grandes. Enfin *Cohn*[11] a donné une technique spectro-

graphique pour le dosage de petites quantités de K et de Rb dans des matériaux d'origine biologique. Mais le travail de *Gabriel Bertrand, Didier Bertrand* et *C. Courty*[12], sur le dosage de traces de Rb dans des sels de potassium, permet de faire la critique du travail de *Cohn* et de dire que sa technique ne peut que donner l'ordre de grandeur des quantités de K et Rb.

La méthode de *Gabriel Bertrand, Didier Bertrand* et *C. Courty* posséde une sensibilité considérable (limite inférieure du Rb dosable: 0,2 γ (Fig. 1)*, qui permettait d'espérer la possibilité de son emploi et sa généralisation à d'autres alcalins. Nous verrons d'abord la technique à suivre pour le Rb, puis pour le K, le Na et enfin pour le Cs et le Li. Comme cette méthode n'est valable que pour un sel déterminé, il fallait, partant du matériel d'étude envisagé, se débarrasser de tous les sels autres que ceux de Rb et de K, pour aboutir à un anion déterminé. Ce qui exclut *a priori* toute méthode de précipitation, aucun sel de Rb n'étant assez insoluble pour n'avoir pas de perte inférieure à 0,2 γ de métal. L'incinération des matières combustibles étant une bonne méthode d'élimination des substances organiques et pouvant être conduite, comme nous le verrons, sans perte de Rb, la méthode de séparation du Rb à rechercher doit être applicable aux cendres d'origine biologique. Celles-ci sont surtout constituées par de carbonates, phosphates, chlorures, sulfates et silicates de Na, K, Ca, Mg, Al et Fe. L'insolubilisation de la silice est assez facilement obtenue par évaporation à sec en présence d'acide chlorhydrique concentré, transformant en outre les carbonates en chlorures. Mettant alors à profit la technique très précise utilisée par *Gérard*[13] pour le dosage du K et du Na chez les animaux, technique basée sur les recherches de *Gabriel Bertrand*, nous avons utilisé aussi la précipitation des phosphates en milieu fortement ammoniacal pour l'élimination de Ca, Mg, Al, Fe et des traces d'alcalino-terreux Sr et Ba éventuellement présents. Dans le cas des plantes où il n'y a en général pas assez de phosphates par rapport aux cations, on ajoute progressivement et presque sans excès du phosphate d'ammoniaque. Une centrifugation énergique permet facilement la séparation du précipité. *Gérard* avait vérifié pon-

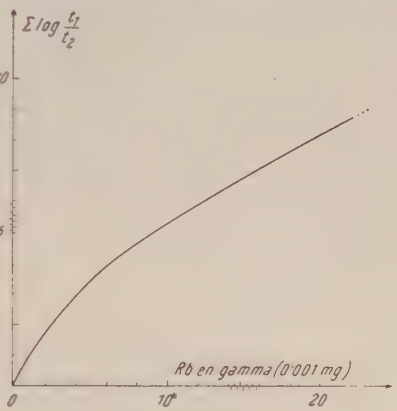


Fig. 1.

* Les courbes ne sont donnés qu'à litre indicative et n'ont pas de valeur absolue.

déralement qu'à condition de laver ce précipité il n'y avait pas de perte de K, ni de Na. La spectrographie prouve qu'il en est bien ainsi pour le K, le Rb et le Cs, alors que le Na, et davantage le Li, sont légèrement absorbés, mais peuvent être séparés par un lavage soigneux en milieu ammoniacal. Cessant ici d'utiliser la technique de *Gérard*, nous avons éliminé les acides phosphorique et sulfurique par précipitation au moyen d'un sel de plomb, ce dernier étant du chlorure, beaucoup plus facile à obtenir pur que les autres sels de ce métal et en outre suffisamment soluble, étant donné les petites quantités de réactif nécessaires. En outre le précipité de plomb en milieu légèrement chlorhydrique n'adsorbe pratiquement pas les alcalins, contrairement à ce qui se passe, par exemple, avec l'acétate de plomb, si l'on n'opére pas dans des conditions très strictes indiquées par *Gérard*. On pourrait parfaitement utiliser le baryum, sous forme de chlorure, mais ici l'adsorption est un peu plus forte, en outre le baryum génerait considérablement par la suite, alors que le plomb en excès (qu'il vaut mieux éviter) est facile à éliminer par l'hydrogène sulfuré, en milieu acide; le précipité de sulfure de plomb est en outre très facile à laver.

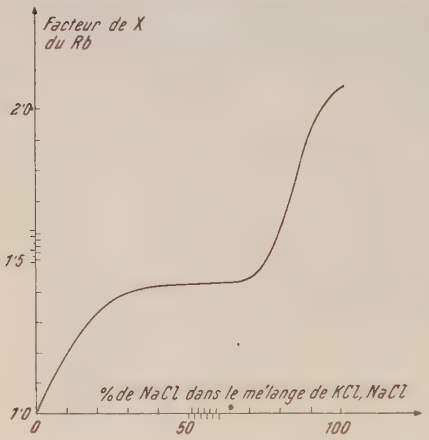


Fig. 2.

Une évaporation à sec du liquide filtré après passage à l'hydrogène sulfuré, ne laisse plus qu'un mélange de chlorures alcalins et d'ammonium. On transvase ceux-ci, après dissolution dans un peu d'eau, dans une capsule de platine, et, après évaporation à sec, on passe au four à une température *inférieure au rouge*. Le chlorure d'ammonium se volatilise rapidement, alors que les chlorures alcalins restent en entier dans la capsule. Après disparition des vapeurs blanches, on reprend le résidu de la capsule par un peu d'eau très légèrement acidulée par de l'acide chlorhydrique, on sèche et on pèse. Le résidu ainsi obtenu est pratiquement constitué par un mélange de chlorures alcalins où le Li, Rb, Cs n'existent qu'à l'état de traces. Dans l'état actuel de la chimie analytique il est parfaitement vain d'essayer de séparer ces métaux sans en perdre. C'est donc ce mélange de chlorures qui est utilisé pour le dosage spectrographique en suivant la méthode de *G. Bertrand*, *D. Bertrand* et *C. Courty*. Mais la courbe de dosage de Rb dans le chlorure de K n'est pas valable ici. En effet, en mettant une même quantité de Rb dans 10 mg de KCl et dans 10 mg de NaCl, le chiffre trouvé pour le NaCl en se servant de la courbe étalon établie pour le KCl est d'environ 50% trop faible. Il

devient nécessaire d'établir un abaque. La remarque suivante permet heureusement de s'en dispenser: pour les quantités étudiées, soit de 0 à 70 γ (ce dernier chiffre étant bien supérieur à ce qu'il est possible de trouver dans 10 mg d'un mélange de chlorures de K et Na provenant des animaux ou des végétaux) le facteur de correction à apporter au chiffre de Rb trouvé pour un mélange donné de KCl, NaCl, en se reportant à la courbe étalon établie à partir du seul KCl, reste le même quand la proportion de Rb varie. Il suffit donc de tracer la courbe donnant la valeur de ce facteur en fonction des différents mélanges de KCl et de NaCl. Cette courbe (Fig. 2) possède pratiquement un palier pour des valeurs de NaCl variant de 35 à 70%, mais cet aspect provient des conditions techniques suivies.

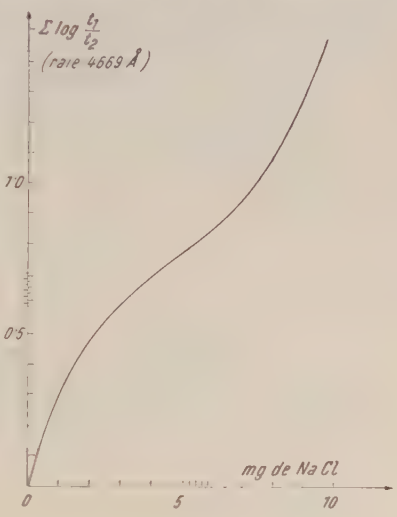


Fig. 3.

L'utilisation de cette courbe nécessite la connaissance du pourcentage de NaCl dans le KCl du mélange étudié. On pourrait opérer ce dosage chimiquement, mais il faudrait augmenter la prise d'essai d'une façon importante. La technique spectrographique employée pour le Rb reste heureusement valable pour le Na, en employant la raie très floue 4669 Å et le fond continu de longueur d'onde juste inférieur; le noircissement de référence utilisé est celui du fond continu de la lampe à hydrogène de *Chalonge* et *Lambrey* juste avant la raie de l'hydrogène 4340,47. Ce fond possède à cet endroit un minimum très net facile à répérer au microphotomètre enregistreur de *Sannié* et c'est ce minimum qui sert de noircissement étalon. Si l'émulsion utilisée n'avait pas dans cette région spectrale une courbe de sensibilité et un gamma à peu près constant, il faudrait utiliser pour le noircissement de référence, une région de même longueur d'onde, soit 4670 Å. La précision de 5 à 7% est un peu moins bonne que pour le Rb, mais reste suffissante pour le cas qui nous occupe et permet le dosage du sodium pour des quantités de NaCl comprises entre 0,5 et 100% dans le mélange de KCl, NaCl sur le même cliché que celui servant au dosage du Rb (Fig. 3). Pour des quantités de NaCl inférieures à 0,5%, il faut utiliser la raie de Na 4979 Å avec le fond continu immédiatement après, le noircissement de référence étant celui de la raie Hβ de l'hydrogène. On se trouve alors dans l'obligation de faire un cliché spécial avec une émulsion panchromatique, en utilisant par exemple

le film Kodak panchro panatomic X, développé avec le même révélateur que pour le Rb mais pendant 12 minutes (18°). La précision, très bonne, est la même que pour le Rb, soit quelques %, et permet le dosage entre 5 et 300 γ de Na, plus que suffisant d'ordinaire comme sensibilité inférieure pour le dosage du Na dans un matériel d'origine biologique (Fig. 4).

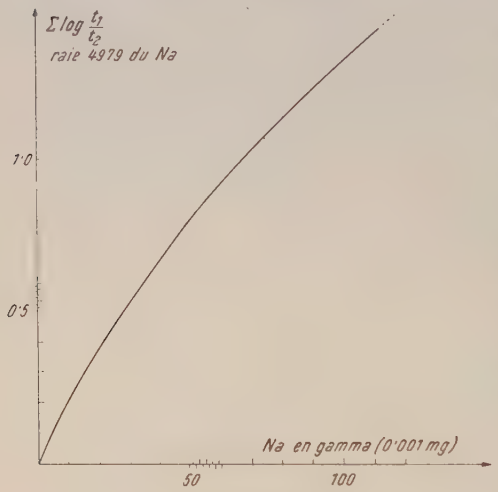


Fig. 4.

Comme la précision du dosage de Na est insuffissante pour avoir le chiffre de potassium dans le cas de faibles quantités de ce métal, il faut le doser. Ce que l'on peut faire en employant la même technique que pour le Rb et le Na avec la raie 5359,7 Å de K et le fond continu juste après. Le noircissement de référence est celui de la raie Hα de la lampe à hydrogène de *Challonge et Lambrey*. Le film utilisé est, comme pour le dosage de petites quantités de Na, le film panchro panatomic X de Kodak. La précision reste de quelques % et permet le dosage entre 2,5 γ et 2 mg de K (Fig. 7).

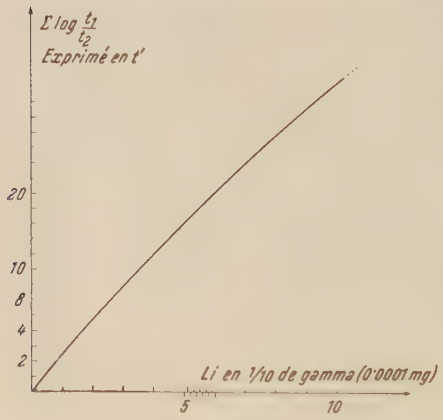


Fig. 5.

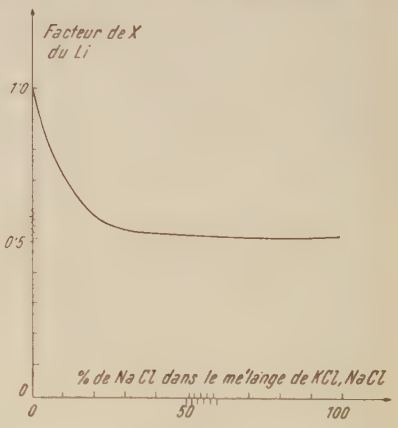


Fig. 6.

Connaissant le poids total de KCl plus NaCl, il est facile, en dosant celui des deux constituants qui est le moins abondant, de déduire le poids de l'autre par simple différence. L'erreur ainsi commise est suffisamment

faible pour justifier cette façon de faire et évite le dosage de l'autre élément (toujours possible) puisque, ainsi que nous allons le voir pour le dosage du Li, on se trouve amené à faire un cliché directement utilisable pour le dosage du K ou de petites quantités de Na.

Les remarques faites à propos du Rb restent valables pour le Cs et le Li. Pour le Cs la raie 4593,18 Å, assez bien isolée, ne permet pas de doser moins de 10 γ de Cs, quantité beaucoup trop élévée pour les animaux et les végétaux. La raie la plus sensible du Cs 4555,5 Å qui permettrait de doser jusqu'à la quantité inférieure de 0,2 γ de Cs est trop proche de la raie d'arc du Ba 4554,04, extraordinairement sensible et que l'on retrouve sur tous les clichés faits dans les conditions precitées à partir d'un matériel d'origine biologique. Ne disposant pas pour le moment d'un spectrographe suffisamment dispersif, il nous a fallu employer l'artifice suivant: l'expérience a prouvé que du noircissement des raies Cs plus Ba, on pouvait enlever le noircissement dû au Ba, à condition que la correction reste faible. Le Ba est très facile à doser avec la raie 5535 Å, très sensible, et du chiffre ainsi trouvé on peut déduire le degré d'intensité que presenterait la raie 4555,5, si le Cs était seul. Les courbes doivent, comme pour le Rb, être corrigées en fonction de la teneur en Na du mélange des chlorures. La précision finale est évidement moins bonne, environ 20%, alors que sans cette correction elle reste du même ordre que pour le Rb (fig. 8, 9, 10).

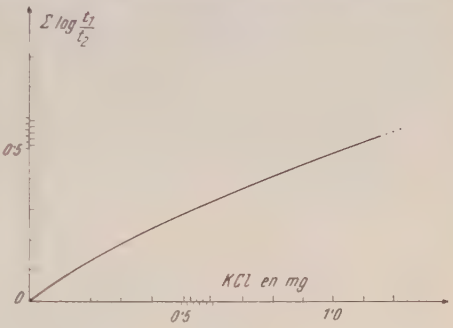


Fig. 7.

Pour le Li, la raie 6707,86 Å extrêmement sensible (puisqu'elle permet le dosage jusqu'à la limite inférieure de 0,01 gamma) est bien isolée, les seules raies voisines 6710,39 du Pt et 6717,7 de Ca ainsi que 6715,42 de Cr n'étant jamais visibles sur le cliché et, en tous cas, suffisamment séparées pour ne pas gêner. En employant le film panchro panatomic X de Kodak, il n'y a pas de fond continu dû au spectre, si bien que l'on peut directement comparer le noircissement de la raie du Li à celui de la raie Hα de l'hydrogène de la lampe étalon, ainsi qu'il avait été signalé[12]. Comme pour le Rb et le Cs, il faut connaitre le pourcentage de NaCl dans le mélange de chlorures, la sensibilité de la raie de Li étant ici beaucoup plus grande dans le NaCl que dans le KCl (fig. 5 et 6).

Il est possible en utilisant le film panchromatique de doser sur un seul cliché tous les éléments alcalins, mais ce type d'émulsion possède un fond continu de densité optique élevée (voisine de 1), si bien que.

lorsqu'on le peut, il est préférable pour augmenter la sensibilité et la précision des mesures de faire un cliché special avec une émulsion orthochromatique ou même positive, pour le Rb et les fortes quantités de Na, ainsi qu'il a été dit. Comme, en définitive, il ne faut que 20 mg environ d'un mélange de chlorures alcalins, des prises d'essai de 1 g de matière sèche pour les végétaux et de 2 g pour les animaux sont plus que suffisantes.

Causes de pertes. La calcination n'introduit pas de pertes, mais il est indispensable de transformer les carbonates en chlorures en opérant sur les cendres totales, parce que le Rb et surtout le Li (en fait tous les alcalins) restent à des degrés divers adsorbés en traces par les carbonates alcalino-terreux (seul le potassium l'est assez peu pour qu'en pratique on puisse considérer qu'il ne l'est pas). La calcination doit être conduite en deux temps*. En ne chauffant pas, au rouge nous n'avons pas constaté de pertes d'alcalins dans les très nombreux contrôles exercés.

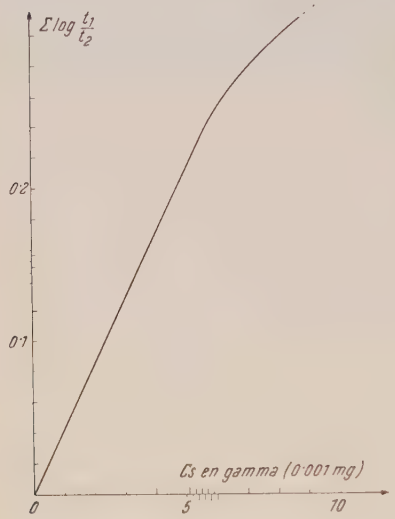


Fig. 8.

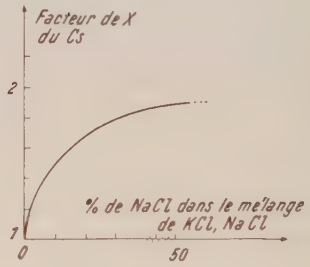


Fig. 9.

Ainsi qu'il a déjà été signalé, le précipité de phosphates ne retient que peu les alcalins, il en est de même pour le précipité de sulfure de plomb. Comme ces deux précipités sont en outre très faciles à laver et comme dans le cas particulier qui nous occupe ici, les prises d'essais sont faibles, les concentrations en sels le sont aussi, facilitant les lavages et permettant d'affirmer qu'il n'y a pas de pertes, ainsi que le montrent les quelques exemples donnés plus loin.

Causes de gains. Celles-ci sont beaucoup plus nombreuses. En premier lieu, on ne doit faire les calcinations que dans du matériel métallique (de préférence en platine) ou bien dans de la silice transparente, parce que la couverte des capsules en porcelaine ou alumine contient des alcalins

* Voir à ce sujet *Gabriel Bertrand.* Guide des manipulations de chimie biologique, Paris 1912.

et est toujours un peu attaquée. L'eau doit avoir été distillée dans un appareil métallique, sinon elle contient toujours un peu d'alcalins. On peut la conserver dans un récipient en verre, à condition que l'on ait au préalable contrôlé qu'à la longue celui-ci ne cède à l'eau que des quantités de métaux inférieures à celles que l'on puisse doser; il faut noter que peu de verres remplissent ces conditions. Pour la même raison toutes les opérations chimiques: précipitations, évaporations, ne doivent être faites que dans des récipients éprouvés. Il est presque impossible de ne pas avoir de gains de K et de Na, mais on peut réduire ceux-ci à des quantités bien inférieures: à celles des limites inférieures indiquées dans la méthode décrite ici. Le phosphate d'ammoniaque et le chlorure de plomb doivent être soigneusement purifiés ainsi que l'acide chlorhydrique et l'ammoniaque, seuls réactifs employés. En particulier, nous n'avons pas pu avoir de sels sans Rb mais nous avons pu en obtenir qui en contiennent assez peu pour que l'apport puisse être considéré comme négligeable. Enfin il faut contrôler très soigneusement les charbons spectrographiques, en employant pour cela la technique de dosage à blanc, beaucoup plus sensible que tout autre procédé. Il est très difficile de trouver des charbons ne contenant pas de Rb ou de Li dans ces conditions; tous contiennent du Na, mais heureusement en quantité trop faible pour être décelable avec la raie 4979 Å, utilisée pour les faibles quantités de ce métal.

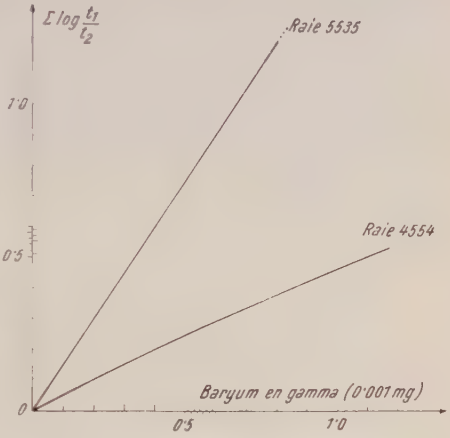


Fig. 10.

Contrôle de la validité de la méthode. Pour le K et le Na le contrôle a été fait en employant la méthode chimique de *Gabriel Bertrand*[14]. Nous ne donnerons ici que quelques exemples (non choisis parmi les meilleurs) de façon à ne pas allonger inutilement ce mémoire:

	g par kg sec (spect.)		g par kg sec (chimie)		différence %	
	Na	K	Na	K	Na	K
Feuilles de ricin	0,024	3,65	0,029	3,81	20	4,2
Graines de haricot	0,09	14	0,082	13,6	9,7	2,94
Salicornia radicans	125	6,29	120,5	6,08	3,75	3,2

Comme l'accord était beaucoup moins bon dans le cas de petites quantités de Na, nous avons fait de nombreux contrôles par addition de Na sous une forme ou sous une autre et nous avons toujours retrouvé les quantités de Na à quelques % près. La méthode spectrographique se révèle donc supérieure à la méthode chimique dans le cas de petites quantités de Na.

Pour le Rb, le Cs et le Li, par suite du manque de méthode chimique, nous n'avons pu faire de contrôle que par addition pour retrouver les quantités ajoutées à quelques % près. Par exemple, avec des feuilles de Tabac, qui sont relativement très riches en K et Ca, nous avons ajouté à un gramme de feuilles sèches:

147	γ	de	Rb	et retrouvé	143
22	γ	„	„	„ „	21
45	γ	„	Li	„ „	46
0,6	γ	„	„	„ „	0,55.

Avec 100 mg de phosphate d'ammoniaque ajouté

2,7	γ	de	Rb	et retrouvé	2,8
2,02	γ	„	Li	„ „	2,06.

On est donc en droit de dire que la méthode donne toute satisfaction pour le but recherché.

Résumé de la technique suivie: La prise d'essai du matériel d'origine biologique (1 g sec environ pour les végétaux et 2 g pour les animaux étant plus que suffisant) est calcinée en deux temps dans une capsule de platine. Les cendres additionnées d'acide chlorhydrique concentré sont évaporées à sec pour insolubiliser la silice. Le résidu soluble dans l'eau est précipité par l'ammoniaque concentré en excès, puis par le phosphate d'ammoniaque sans excès: après lavage du précipité, les liquides réunis sont concentrés au bain-marie, recentrifugés si besoin est, et évaporés à sec pour chasser l'excès d'ammoniaque. Le résidu repris par l'eau est acidulé par quelques gouttes d'acide chlorhydrique normal et précipité par une solution saturée de chlorure de plomb employée en faible excès. Après centrifugation, le liquide est passé à l'hydrogène sulfuré pour éliminer l'excès de plomb toujours présent, filtré, le filtre lavé. Les liquides réunis sont évaporés à sec, le résidu transvasé dans une capsule de platine, séché et passé au four à température juste suffisante pour chasser les sels d'ammonium. Le résidu est pesé, homogénéisé par redissolution et évaporation en milieu de p_H acide (au besoin, broyer au mortier) et passé à la spectrographie suivant les détails donnés dans ce mémoire.

Quand on ne dispose pas d'un poids de chlorure suffisant, on peut néanmoins faire le dosage des alcalins en opérant comme suit: les chlorures sont divisés en deux parts, dans l'une on ajoute suffisamment de

ClK et dans l'autre de ClNa pour pouvoir faire la spectrographie, la première fraction sert au dosage du Na et la seconde à celui de K, l'une et l'autre pour Li et Rb. Naturellement, ni le ClK ni le ClNa ajoutés ne doivent contenir de Rb ou Li ou Ca, de Na pour le ClK et de K pour le ClNa.

Les limites inférieures des métaux dosables sont, avec le matériel employé, environ de 0,01 γ pour Li, 5 γ pour Na, 25 γ pour K et 0,2 γ pour Rb et Cs dans environ 10 mg d'un mélange de chlorures de Na et de K, quantité bien suffisante pour les dosages dans les milieux d'origine biologique. L'erreur sur un seul dosage n'est que de quelques pour cent.

Résumé.

Après minéralisation en deux temps des matériaux choisis et reprise des cendres par l'acide chlorhydrique, on élimine les alcalino-terreux par le phosphate d'ammoniac, puis l'excès du réactif phosphatique par le chlorure de plomb qui transforme en même temps les sulfates en chlorures; enfin, on précipite l'excès de plomb par l'hydrogène sulfuré et en chasse le chlorhydrate d'ammoniac formé au cours des opérations par volatilisation au-dessous du rouge. Il reste un mélange de chlorures alcalins où se trouve la totalité de ceux-ci.

10 mg de ce mélange sont analysés spectrographiquement suivant la technique de *Gabriel Bertrand*, *Didier Bertrand* et *C. Courty*. Des courbes étalons permettent le dosage direct du Potassium avec la bande 5859,7 A. du Sodium avec la bande 4669 A, quand il y a plus de 100 microgrammes de celui-ci et avec 4979 A quand il y en a de 5 à 200 microgrammes. Le Lithium et le Rubidium sont dosés en utilisant respectivement les raies 6707,86 et 4201,8 A. Des courbes de corrections sont nécessaires pour corriger le chiffre ainsi trouvé suivant les proportions relatives de potassium et de sodium. Pour le Césium, on utilise la raie 4555,5 A, mais en cas de spectrographe pas assez dispersif, il faut doser le Baryum avec la raie 5535 A; remonter de ce résultat au degré d'intensité que présenterait la raie 4554 si le baryum n'était pas accompagné de Césium, et déduire cette intensité de celle de l'ensemble des raies 4554 et 4555,5 pour avoir finalement la teneur en Césium. Cette correction n'est évidemment possible que si elle est faible.

Il est ainsi possible de doser jusqu'à la quantité minima de 0,01 microgrammes de Lithium, de 0,2 microgrammes de Rubidium et de Césium, avec une erreur de quelques pour cent seulement pour le Li et le Rb et de 10 à 20% pour le Cs.

Zusammenfassung.

Zur Mikrobestimmung der Alkalimetalle in biologischem Milieu wird das Untersuchungsmaterial nach Veraschung in Salzsäure aufgenommen, die Erdalkalien mit Ammoniumphosphat gefällt, das überschüssige Phosphat

mit Bleichlorid entfernt, womit gleichzeitig die Sulfate in Chloride umgewandelt werden. Das überschüssige Blei wird mit Schwefelwasserstoff gefällt und sodann das gebildete Ammoniumchlorid durch Erhitzen unter Rotglut vertrieben. Es verbleibt das Gemisch der Alkalichloride, dessen spektrographische Analyse in ihren Einzelheiten beschrieben wird. Die beigegebenen Kurven ermöglichen die Bestimmung des Kaliums mit Hilfe der Linie bei 5859,7 Å, des Natriums bei 4669 Å bzw. 4979 Å, des Lithiums bei 6707,86 Å, des Rubidiums bei 4201,8 Å, des Caesiums bei 4555,5 Å. Die sich aus dem Verhältnis K : Na ergebenden Korrekturen sind beigegebenen Diagrammen zu entnehmen. Bis jetzt ist die Bestimmung folgender Minimalmengen möglich: 0,01 γ Li, 0,2 γ Rb mit einem Fehler von wenigen Prozenten, 0,2 γ Cs mit einem Fehler von 10—20%.

Summary.

For the microdetermination of the alkali metals in biological material, the sample is ashed, taken up in hydrochloric acid, the earth alkalies precipitated with ammonium phosphate, the excess phosphate precipitated by means of lead chloride, whereby at the same time the sulfates are converted into chlorides. The excess lead is thrown down by hydrogen sulfide, and the ammonium chloride is then driven off by heating below redness. The residue consists of a mixture of alkali chlorides, whose spectrographic analysis is described in detail. The accompanying curves make possible the determination of potassium with the aid of the line at 5859,7 A, of sodium at 4669 A or 4979 Å, of lithium at 6707,86 Å, of rubidium at 4201,8 A, of cesium at 4555,5 A. The corrections arising from the ratio K : Na can be taken from the accompanying diagrams. Up to the present, it has been possible to determine the following minimum quantities: 0,01 γ Li, 0,2 γ Rb, with an error of several percent; 0,2 γ Cs, with an error of 10—20 percent.

Bibliographie.

[1] *R. Bunsen* et *G. Kirchhoff*, Ann. Chem. **122**, 347 (1862).
[2] *Grandeau*, Ann. chim. phys. **67**, 155 (3) (1863).
[3] *E. Wilke-Dörfurt*, Z. anorg. Chem. **75**, 132 (1912).
[4] *W. O. Robinson*, Ind. Engng. Chem. **10**, 50 (1918).
[5] *P. Freundler* et *Y. Ménager*, C. r. acad. sci. Paris **182**, 1158 (1926).
[6] *R. Godeffroy*, Ber. dtsch. chem. Ges. **9**, 1363 (1876).
[7] *R. Bossuet*, Bull. soc. chim. France **51**, 681 (1932).
[8] *A. de Gramont*, C. r. acad. sci. Paris, **157**, 1364 (1914).
[9] *Carnot*, Traité d'analyse II, p. 666, Dunod, Paris, 1898.
[10] *H. Lundegardh*, Metallwirtsch., Metallwiss., Metalltechn. **17**, 1222 (1938)
[11] *W. M. Cohn*, J. Appl. Phys. **10**, 200 (1939).
[12] *G. Bertrand, D. Bertrand* et *C. Courty*, C. acad. sci., Paris **217**, 520 (1943).
[13] *Gérard*, Thèse, Paris 1912.
[14] *G. Bertrand*, Ann. agronom. **46**, 1 (1929).

Istituto di chimica farmaceutica dell'Università di Ferrara.

Über den Nachweis und die Unterscheidung einiger Nicotinsäure-Derivate.

Von

Gilda Cavicchi.

Mit 5 Abbildungen.

(Eingelangt am 24. Mai 1950.)

Die dauernd ansteigende Verwendung von organischen Substanzen in der Therapie läßt es besonders wünschenswert erscheinen, analytische Methoden aufzufinden, welche ihren Nachweis auch in Gegenwart von Verbindungen ähnlicher Konstitution ermöglichen.

Abb. 1. Jodwismutsaures Nicotinsäureamid.

Die mikrochemische Analyse begnügt sich nicht nur mit geringsten Mengen der nachzuweisenden Substanz und der Reagenzien, sondern sie bietet überdies beachtliche Vorteile gegenüber den klassischen Analysenmethoden in bezug auf Geschwindigkeit, Empfindlichkeit und Genauigkeit.

Trotz der großen Zahl der vorgeschlagenen und mit Erfolg verwendeten Reagenzien haben wir es für nützlich gehalten, komplexe Säuren, wie die Jodwismutsäure und die Bromwismutsäure, zum Nachweis einiger organischer Basen heranzuziehen. Hierbei sollten einige Verbindungen untersucht werden, welche seit nicht langer Zeit in die Therapie eingeführt

sind: Das Nicotinsäureamid, das Diäthylamid der Nicotinsäure (im Handel als Coramin und Cardiamin bekannt) und das Oxymethylamid der Nicotinsäure (im Handel als Bilamid bekannt).

Obwohl Kalium-Wismut-Jodid seit langem als allgemeines Alkaloidreagens bekannt ist, konnten wir in der Literatur keinen Hinweis finden, daß die Reaktionsprodukte mit Alkaloiden homogene Substanzen von definierter chemischer Struktur und Kristallform sind. Wir verweisen

Abb. 2. Jodwismutsaures Coramin.

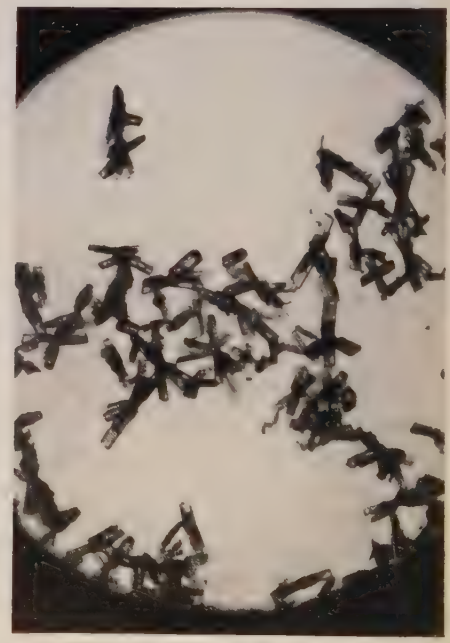


Abb. 3. Jodwismutsaures Bilamid.

diesbezüglich auf die Untersuchungen von *Francois* und *Séguin*[1], *Moreau* und *Isnard*[2] über die Jodwismutsäureverbindungen des Chinins und des Emetins.

Bei der Umsetzung von Kalium-Wismut-Jodid mit einer großen Zahl von organischen Basen haben wir feststellen können, daß es bei Einhaltung bestimmter Konzentrationen von Reagens und Base sowie eines bestimmten p_H (welches möglichst unter 4 liegen soll) möglich ist, homogene, kristallisierte Substanzen von gut definierter und konstanter Zusammensetzung zu erhalten.

Zur Differenzierung der drei erwähnten Basen wurde die schwefelsaure Lösung des Reagens nach der Vorschrift von *Capelli* benützt[3]. Die damit erhaltenen Produkte sind gut kristallisiert und von mehr oder

weniger intensiv roter Farbe. Sie wurden unter dem Mikroskop mit der von *Martini*[4] beschriebenen Technik untersucht. Wie aus den Mikrophotographien hervorgeht, ist diesen Fällungen ein charakteristischer Habitus eigen, der es erlaubt, diese Verbindungen mit ähnlicher chemischer Struktur eindeutig zu unterscheiden.

Wir haben die erhaltenen Verbindungen analysiert und gefunden, daß sie nach der allgemeinen Formel $BiJ_3 \cdot HJ \cdot$ Base gebaut sind und entweder wasserfrei oder in verschiedenem Grade hydratisiert sein können.

Abb. 4. Bromwismutsaures Nicotinsäureamid.

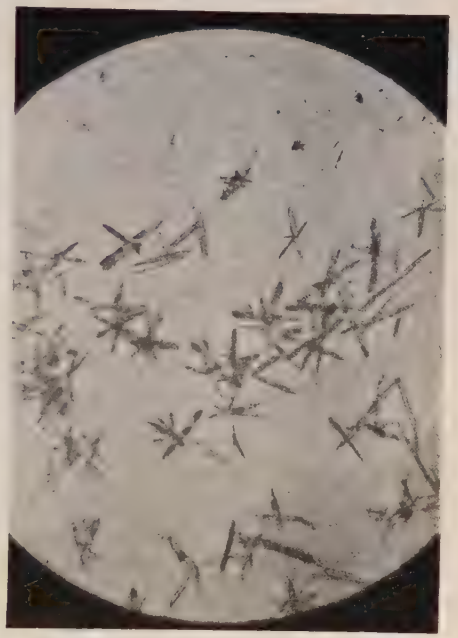


Abb. 5. Bromwismutsaures Bilamid.

Jodwismutsaures Nicotinsäureamid: für $BiJ_3 \cdot HJ \cdot C_6H_6N_2O \cdot 2H_2O$.

Bi	ber.	23,86%;	gef.	23,72%.
J	„	57,95%;	„	57,67%.
N	„	3,19%;	„	3,04%.

Jodwismutsaures Coramin: für $BiJ_3 \cdot HJ \cdot C_{10}H_{14}N_2O \cdot 4H_2O$.

Bi	ber.	20,59%;	gef.	20,97%.
J	„	52,45%;	„	52,30%.
N	„	2,89%;	„	2,58%.

Jodwismutsaures Bilamid: für $BiJ_3 \cdot HJ \cdot C_7H_8N_2O_2$.

Bi	ber.	21,54%;	gef.	21,68%.
J	„	52,34%;	„	52,82%.
N	„	2,88%;	„	2,52%.

Die mit dem Kaliumsalz der Jodwismutsäure erhaltenen Resultate haben uns dazu geführt, die Umsetzung der untersuchten Basen mit dem Kaliumsalz der Bromwismutsäure vorzunehmen und zu untersuchen, ob die hiermit erhaltenen Fällungen zu denselben analytischen Möglichkeiten führen. Obwohl analoges Verhalten dieser Säure sehr wahrscheinlich ist, wurde sie doch bisher nicht zur Fällung von Basen oder Alkaloiden herangezogen.

Das Reagens wurde durch Sättigung einer 50%igen Lösung von Bromwasserstoffsäure mit basischem Wismutkarbonat und nachfolgende Zugabe einiger ml Wasser und Bromwasserstoffsäure hergestellt.

Wir fanden, daß dieses Reagens mit vielen organischen Basen Verbindungen mit wohl definierter chemischer Struktur liefert: wir behalten uns vor, über diese Untersuchungen gesondert zu berichten.

Was die oben genannten vom Nicotinamid abgeleiteten Basen betrifft, zeigen diese ein klar unterschiedenes Verhalten. Das Nicotinamid gibt nach kurzer Zeit glänzende prismatische Kristalle von goldgelber Farbe, das Bilamid führt zur Abscheidung von gelblichen, fast weißen spindelförmigen Nadeln, das Coramin gibt unter den beschriebenen Versuchsbedingungen auch nach langer Wartezeit keinerlei Abscheidung.

Die ersten beiden der genannten Produkte wurden analysiert und ihre allgemeine Formel festgestellt: $BiBr_3 \cdot HBr \cdot Base$.

Bromwismutsaures Nicotinamid: für $BiBr_3 \cdot 2HBr \cdot 2C_6H_6N_2O \cdot 2H_2O$.

Bi	ber.	23,46%;	gef.	23,12%.
Br	„	44,85%;	„	44,89%.
N	„	6,28%;	„	6,44%.

Bromwismutsaures Bilamid: für $BiBr_3 \cdot HBr \cdot C_7H_8N_2O_2 \cdot 2H_2O$.

Bi	ber.	29,15%;	gef.	28,78%.
Br	„	44,58%;	„	44,72%.
N	„	3,90%;	„	3,37%.

Zusammenfassung.

Es wurden die Reaktionsprodukte des Nicotinsäureamids, des Diäthylamids der Nicotinsäure (Coramin) und des Oxymethylamids der Nicotinsäure (Bilamid) mit Kalium-Wismut-Jodid bzw. -Bromid auf ihre Eignung zum mikroskopischen Nachweis der genannten Basen untersucht. Die unter den angegebenen Verhältnissen erhaltenen Produkte sind homogen, haben eine definierte chemische Zusammensetzung und einen charakteristischen kristallographischen Habitus, der ihre Unterscheidung unter dem Mikroskop ermöglicht.

Summary.

The reaction products of nicotinic amide, of nicotinic dimethylamide (coramine), and of the oxymethylamide (bilamide) with potassium bismuth iodide or bromide have been studied with a view to their suitability for the

microscopic detection of these bases. The products obtained under the stated conditions are homogeneous, have a definite chemical composition, and display characteristic crystallographic habits, which makes it possible to distinguish them under the microscope.

Résumé.

On étudie les produits de réaction de l'amide nicotinique, du diéthylamide nicotinique (coramine) et de l'hydroxyméthylamide de l'acide nicotinique (Bilamide) avec le bismuthoiodure ou le bismuthobromure de potassium afin d'examiner leur aptitude à la recherche microscopique des bases nommées ci-dessus. Les produits obtenus suivant des proportions données sont homogènes, ont une composition chimique définie et un aspect cristallographique caractéristique qui rend leur distinction possible sous le microscope.

Diskussion.

H. *E. Stocker* (Horn, Schweiz): Kann man auf die beschriebene Art und Weise auch Trimethylamin und ähnliche Basen nachweisen?

Fr. *G. Cavicchi*: Trimethylamin gibt amorphe oder mikrokristalline Niederschläge ohne charakteristischen Habitus. Soweit andere Basen geprüft wurden, insbesondere Alkanolamine (Aethanolamin, i-Propanolamin usw.)[1], können diese auf analoge Weise differenziert werden. Eine eigene Mitteilung darüber ist in Vorbereitung.

Literatur.

[1] *M. Francois* und *L. Séguin*, J. pharm. chim. (8) **2**, 59 (1925).
[2] *Moreau* und *Isnard*, Bull. sci. pharmacol. **30**, 129 (1923).
[3] *G. Capelli*, Ann. chim. appl. **14**, 254 (1924).
[4] *A. Martini*, Mikrochem. **23**, 159 (1937).

Istituto Studi Tecnologici Industriali, Firenze, und Centro Ortopedico Mutilati „*V. Putti*“, Bologna.

Über die Feststellung aseptischer Knochennekrose durch Bestimmung der Knochenstruktur.

(Vorläufige Mitteilung)*.

Von

Fritz Pavelka und **Giulio Morandi** †.

Mit 9 Abbildungen.

(Eingelangt am 5. Oktober 1950.)

Die röntgenologischen Merkmale, die den von allen pathologischen Kennzeichen freien Knochen vom nekrotischen unterscheiden, sind seit langem bekannt und durch eine reiche Erfahrung am Operationstisch gestützt.

Besonders die Osteomyelitis hat ein reiches Beobachtungsmaterial geliefert. Der nekrotische Anteil der Knochen zeigt typische, konstante Eigenschaften, unabhängig davon, ob die Nekrose durch septische Ursachen eingetreten ist oder nicht. Diese sind eine ausgeprägte Verdichtung des Röntgenschattens, die gänzliche oder zumindest fast vollständige Abwesenheit der normalen Struktur. Die Veränderungen sind scharf begrenzt und lassen so deutlich den nekrotischen Teil vom gesunden unterscheiden.

Diese spezifischen Kennzeichen der Nekrose finden immer ihre pathologisch-anatomische Bestätigung am Operationstisch: Der nekrotische Teil des Knochens hat die Farbe und die Beschaffenheit des Elfenbeins und ist frei von jeder makroskopisch feststellbaren Struktur, mit zackigen Begrenzungsflächen, sehr hart und spröde, mit einem über das normale Maß beträchtlich hinausgehenden spezifischen Gewicht.

Bei der histologischen Prüfung zeichnet sich der nekrotische Knochen durch wesentliche Abweichungen in seiner Struktur, in der alle Merkmale des lebenden Knochens fehlen, aus.

* Die Untersuchungen, die dem vorliegenden Bericht zugrunde liegen, sind vom Herbst 1943 bis Juli 1944 ausgeführt worden und konnten der Zeitumstände halber seinerzeit nicht publiziert werden.

Wir wollen hier von allem absehen, was die bisher publizierten Ansichten über die Bildung und den Stoffwechsel des Knochens betrifft, und eine bestimmte Frage beantworten: Besteht im Aufbau des gesunden und nekrotischen Knochens ein Unterschied, welcher sich durch eine Röntgenstrukturanalyse nach *Laue* feststellen läßt?

Diese Frage haben wir an einem reichen Material prüfen und beantworten können*. Unsere Untersuchungen wurden im wesentlichen an durch Osteomyelitis hervorgerufenen Knochensequestern durchgeführt, die sich infolge von Kriegsverletzungen ausbildeten, oder aber an endständigen Sequestern von Amputationsstümpfen. Das Untersuchungsmaterial wurde durch 3 Stunden ausgekocht, durch 24 Stunden mit Äther ausgezogen und nach vollständiger Verflüchtigung des Äthers (5 Stunden) für 24 Stunden in $3^0/_0$iges Wasserstoffperoxyd eingelegt. Hierauf wurde es durch einige Tage an der Luft getrocknet und in diesem Zustand der Untersuchung unterworfen. Die Probestückchen stellten Plättchen von 8 bis 10 mm Länge, 2 mm Breite und genau 1 mm Dicke dar. Die Längsachse des Probestückchens fiel mit der des Knochens zusammen.

Als Apparatur diente ein *Philips-Metalix* mit einer Spannung von 45 kV, die K_β-Strahlung der Kupferantikathode war mit einem 10 μ-Nickelfilter entfernt. Gewöhnlich benützten wir die 1-mm-Blende, in Ausnahmefällen die von 0,5 mm; die Expositionszeit betrug normalerweise 30 Minuten, in einigen Fällen bis zu 3 Stunden.

Das Ergebnis dieser Strukturbestimmungen war in allen Fällen gleich und kann wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Der gesunde Knochen zeigt bei der Mikrostrukturanalyse gut ausgebildete Interferenzen mit homogener Schwärzung ohne jede punktförmige Interferenz. Diese Interferenzen treten auf bei:

$12^\circ\,25'$ bis $12^\circ\,45'$
$15^\circ\,35'$ „ $16^\circ\,00'$
$19^\circ\,45'$ „ $20^\circ\,25'$
$23^\circ\,45'$ „ $23^\circ\,45'$
$31^\circ\,00'$ „ $31^\circ\,05'$

und bestehen unserer Meinung nach aus Interferenz*gruppen*.

Aus den betreffenden Radiogrammen kann abgeleitet werden:

a) Die schon bekannte kristalline Struktur des Knochens.

b) Daß die Größe der einzelnen Kristallite unterhalb der Größenordnung 10^{-3} mm liegt.

* Das Untersuchungsmaterial wurde uns vom Direktor des *Centro Ortopedico mutilati* „*V. Putti*" in Bologna, Herrn Prof. Dr. *O. Scaglietti*, liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellt, wofür wir ihm auch an dieser Stelle herzlichst danken.

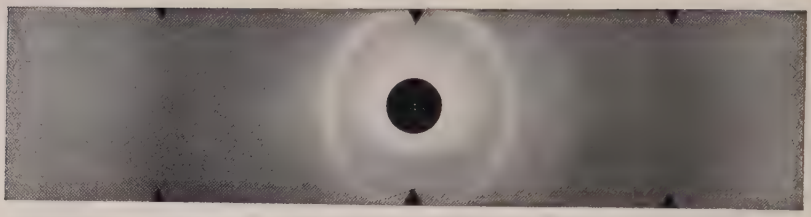
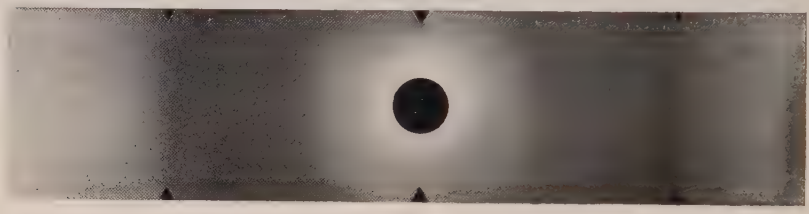
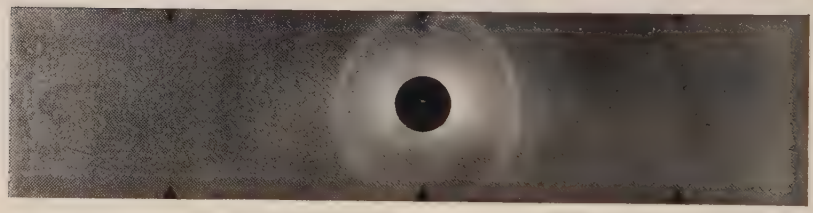


Abb. 1. Gesunder Knochen, aus Schienbein gelegentlich einer Transplantation entnommen.

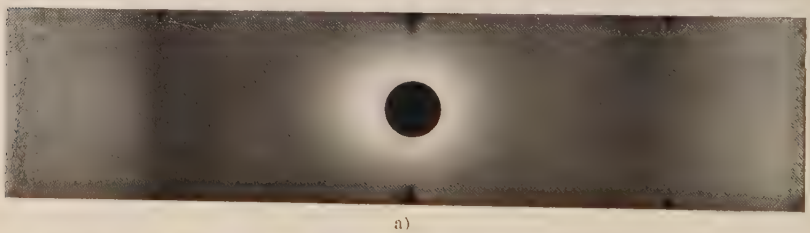


a)

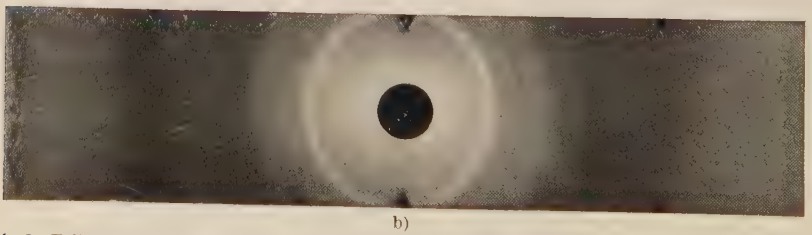


b)

Abb. 2. Fall *Fracchia*. Oberarmverletzung an der Front. a) nekrotischer Knochen; b) gesunder Knochen.

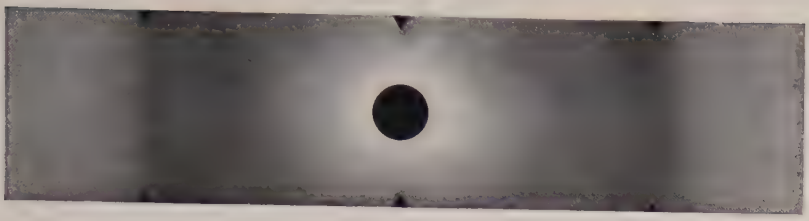


a)

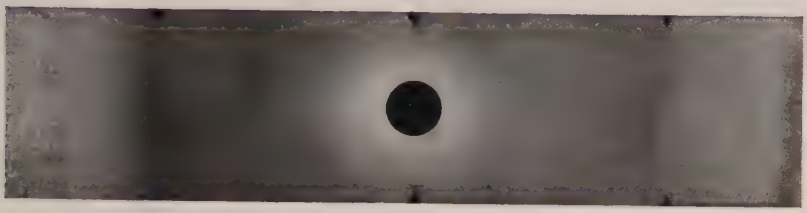


b)

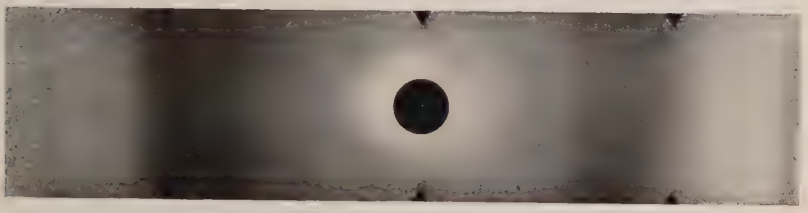
Abb. 3. Fall *Previdi*. Unterarmverletzung bei Luftangriff. a) nekrotischer Amputationsstumpf zwei Monate nach Amputation; b) Diagramm des gesunden Knochens an der Stelle der neuerlichen Amputation.



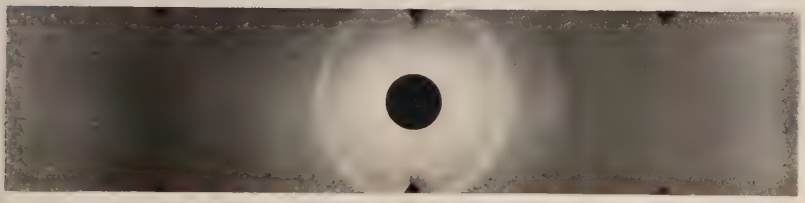
a)



b)



c)



d)

Abb. 4. Fall *Galli*. Oberschenkelverletzung bei Luftangriff. a) nekrotischer Amputationsstumpf zwei Monate nach der ersten Amputation. b) Diagramm des Knochens an der Stelle der Reamputation. Entgegen dem klinischen Befund entspricht das Diagramm an der Stelle der zweiten Amputation neuerdings dem des nekrotischen Knochens. Und wirklich ist weitere zwei Monate später röntgenologisch ein spontaner endständiger Sequester feststellbar, worauf eine dritte Amputation erfolgt. c) Diagramm des erwähnten spontanen endständigen Sequesters. d) Diagramm an der Stelle der dritten Amputation: gesunder Knochen.

c) Daß keine Faserstruktur feststellbar ist, wie es der mikroskopische Befund erwarten ließe; die Kristallite befinden sich im Gegenteil in vollkommener Unordnung.

2. Der nekrotische Knochen zeigt keinerlei Interferenzen und verhält sich wie eine amorphe Substanz. Die ursprüngliche Struktur des Knochens ist verlorengegangen.

3. Zwischen diesen beiden Zuständen bestehen natürlich alle Stufen eines allmählichen Überganges. Wir konnten Fälle feststellen, bei denen die Röntgendurchleuchtung sowie die klinischen Feststellungen Nekrose ausgeschlossen haben, während die Röntgenstrukturbestimmung bereits imstande war, die beginnende Veränderung festzustellen. Das Diagramm zeigt dann Übergangsstadien zwischen Fall 1 (gesunder) und Fall 2 (nekrotischer) Knochen, die sich je nach dem Fortschritt der phatologischen Veränderungen mehr dem Fall 1 oder aber dem Fall 2 nähern.

Die Kennzeichen dieses Zwischenstadiums sind:

a) Abnehmende Zahl der feststellbaren Interferenzen. Gewisse Interferenzen erweisen sich persistenter als die anderen.

b) Die Interferenzlinien verbreitern sich und durch Zusammenfließen von zwei oder mehreren Interferenzstreifen bilden sich breite, verwaschene Interferenzstreifen.

Aus den beigefügten Abbildungen wird besser als durch Worte das Dargelegte illustriert.

Hier sei nur beiläufig erwähnt, daß man gegenwärtig der Meinung ist, daß die Zusammensetzung des Knochens einem Apatit entspricht, und zwar entweder einem Dehalyt $(CaCO_3)_4 \cdot Ca_3(PO_4)_2$ oder aber einem Hydroxylapatit $Ca_{10}(PO_4)_6 \cdot (OH)_2$ oder $2\,Ca_3(PO_4)_2 \cdot CaCO_3$. Wie man sieht, sind in dieser Beziehung die Ansichten noch sehr divergent. Das kann auch nicht wundernehmen, wenn man bedenkt, wie komplex das Gebilde „Knochen" ist.

Mit der vorliegenden Untersuchung wollten wir nur ein Beispiel der unmittelbaren praktischen Anwendung einer modernen Untersuchungsmethode vorführen, die geeignet ist, auf einem wichtigen Gebiet unmittelbar auswertbare Folgerungen zu zeitigen. Diese Arbeit bildete die Basis zu einer Reihe von Untersuchungen, die die chemische Umsetzungsfähigkeit der Knochensubstanz betreffen, über deren Resultate in einem späteren Zeitpunkt berichtet werden wird.

Zusammenfassung.

Durch eine *Laue*-Aufnahme ist es möglich, ohne jede Vermessung oder Berechnung gesunden und nekrotischen Knochen zu unterscheiden. Im Knochen, der der Nekrose verfallen ist, spielen sich Strukturveränderungen ab, die mit Hilfe eines *Laue*-Diagramms oft viele Monate vor der klinischen Diagnose feststellbar sind.

Summary.

By means of a *Laue*-picture, it is possible to distinguish healthy and necrotic bones without measurement or calculation. In bones, which have undergone necrosis, structural changes occur which often can be detected by means of a *Laue* diagram many months before the clinical diagnosis reveals this condition.

Résumé.

A l'aide d'un cliché de *Laue*, il est possible se distinguer entre les os sains et les os nécrosés, sans aucune mesure et sans aucun calcul. Dans l'os qui est attaqué par la nécrose, on voit des changements de structure, décelables au moyen du diagramme de *Laue*, souvent plusieurs mois avant le diagnostic clinique.

Diskussion.

H. Prof. *E. Hayek* (Innsbruck, Österreich): Wir haben durch Auskochen von Rinderknochen Kornvergrößerung und deutliche Hydroxylapatit-Interferenzen erhalten. Ist dies hier möglich? Die Korngröße ist stark p_H-abhängig; wurde das p_H untersucht?

H. *F. Pavelka*: Wir haben nur soviel gekocht, als nötig war, die Fleischteile und das Mark zu entfernen. Auch wir sind überzeugt, daß durch langes Kochen Kornvergrößerung, aber auch Strukturveränderung eintreten kann. Letzteres aber wollten wir für unsere Zwecke, zu denen die Strukturbestimmung diente, vermeiden.

H. Prof. *K. Lang* (Mainz, Deutschland): Gehen die Veränderungen der Struktur des Knochens mit analytisch faßbaren Veränderungen einher?

H. *F. Pavelka*: Die Analyse der Asche führt zu keinem Resultat. Der Unterschied in der Zusammensetzung gesunder Knochen streut zehnmal mehr (35 bis 55%) als der Unterschied in der Zusammensetzung gesunder und nekrotischer Knochen beträgt (1 bis $1^1/_2$%).

H. *E. Abrahamczik* (Ludwigshafen/Rh., Deutschland): Welche Substanz gibt die Interferenzstreifen beim gesunden Knochen?

H. *F. Pavelka*: Keinesfalls Calciumphosphat oder -Carbonat von denen wir Diagramme aufgenommen haben. Die Substanz ist teils organisch, teils anorganisch. Die Länge dieser Kristallite beträgt 6,8 A, entspricht also der Länge eines Dipeptids. Der anorganische Anteil dient offenbar als Gerüst für das sonst spiralige Peptidmolekül.

H. Prof. *M. Lipp* (Aachen, Deutschland): Können diese Untersuchungen auch auf Zähne angewendet werden?

H. *F. Pavelka*: Wenige Untersuchungen dieser Art wurden bereits vorgenommen, es zeigten sich jedoch große Schwierigkeiten. Es ergaben sich Anzeichen für die Anwesenheit einer großen Zahl von wesentlichen Elementen, von denen man bisher nichts wußte. Eine ausführliche Mitteilung darüber wird noch erfolgen.

Aus dem Institut für Veterinär-Chemie der Humboldt-Universität Berlin.

Untersuchungen zur sedimetrischen Analyse: Modellversuche über Raumfaktoren.

Von

Heinz Chomse.

Mit 5 Abbildungen.

(Eingelangt am 13. November 1950.)

Die Beziehungen zwischen Gewicht und Volumen eines aus einer Lösung zur Sedimentation gebrachten Niederschlages sind in komplizierter Art von zahlreichen Faktoren abhängig, über deren Einflüsse im einzelnen noch keine eingehenden Kenntnisse vorliegen. Selbst bei möglichst genauer Einhaltung bestimmter Bedingungen ergeben mit jedesmal der gleichen Gewichtsmenge einer Stoffkomponente erzeugte Niederschläge in wiederholten Versuchen keineswegs gleiche Niederschlagsvolumina und ebensowenig entsteht bei Vorliegen der n-fachen Gewichtsmenge der Stoffkomponente mit Sicherheit ein n-faches Volumen des Sediments. Die Forderung nach einer möglichst einfachen Proportionalität zwischen dem Gewicht einer zu bestimmenden Stoffkomponente und dem Sedimentvolumen des aus ihr erzeugten Niederschlages läßt sich nicht allgemein mit einer solchen geringen Fehlergrenze realisieren, wie sie für quantitativ-analytische Anwendungen zumeist gefordert werden muß. Obwohl daher die „sedimetrische Analyse" sich prinzipiell insbesondere durch Schnelligkeit, Materialersparnis und Einfachheit der apparativen Hilfsmittel sowie der auszuführenden Operationen auszeichnen würde, mußten ihr umfassende Erfolge, wie sie andere nichtgravimetrische Methoden (z. B. die Kolorimetrie) erzielten, versagt bleiben. So ist es auch erklärlich, daß bisher nur vereinzelte Untersuchungen diesem Problem gewidmet worden sind. Um so interessanter erscheint es, in systematischen Studien den Versuch zu unternehmen, Aufklärung über den Komplex der Faktoren zu erlangen, deren Zusammenwirken die Beziehungen zwischen dem Gewicht einer Stoffkomponente und dem Volumen des sie enthaltenden Sedimentes regeln.

Neben den Primär- und Sekundärfaktoren[1] physikalischer und chemischer Natur besitzen auch räumliche Faktoren, wie sie sich etwa in Form, Größe, Anzahl und Gestalt der Niederschlagsteilchen und dem dem Sediment gebotenen Raum äußern, grundlegende Bedeutung. Bei einer beschränkten Anzahl von Teilchen ist ferner die Wahrscheinlichkeit, daß die Lagerung der Partikel innerhalb des gesamten Sedimentes jedesmal in konstanter Weise erfolgt, für die überwiegende Mehrzahl der Partikelgestalten gering. Es ist also zu erwarten, daß diese räumlichen Faktoren in besonders starkem Maße das Verhältnis des Gewichtes des zu bestimmenden Stoffes G zu dem Sedimentvolumen V_s beeinflussen.

Da die Niederschlagsteilchen, falls sie durch chemische Reaktionen erzeugt werden, in ihrem Habitus sowie ihrem späteren Verhalten zahlreichen weiteren schwer eliminierbaren Einflüßen unterliegen, dienten zur vorliegenden Untersuchung Partikelmodelle in vergrößertem Maßstabe. Die Verwendung von Modellkörpern schien umso zulässiger, als auch sonst Modelle bei der Aufklärung von Problemen wertvolle Hilfe geleistet haben, wie dies z. B. die Versuche von *K. L. Wolf*[2] über Morphologie der Flüssigkeiten, die Benutzung des Kalottenmodells von *Stuart* durch *Emma Wolffhardt*[3] und *G. Briegleb*[4], die Untersuchungen von *A. Lüttringhaus*[5] über molekulare Oberfläche und Schmelzwärme von Kohlenstoffverbindungen und die von *L. Bragg* und *I. F. Nye*[6] über ein dynamisches Modell einer Kristallstruktur zeigen. So ergeben sich im Rahmen der Arbeit hauptsächlich folgende Vorteile:

In den Modellpartikeln kann ein Niederschlag stets gleicher chemischer Zusammensetzung angenommen werden (z. B. unabhängig von wechselnder Hydratation).

Das Eigenvolumen der Sedimentpartikel V_k ist streng proportional G.

Die aus dem Gewicht G als entstanden gedachten Partikel sind in allen Versuchen nach Zahl, Größe und Gestalt identisch oder in bekannter Weise variiert.

Formveränderungen, z. B. durch Verwachsungen oder Zerbrechen, finden nicht statt.

Wechselwirkungen zwischen Sediment und Lösungsmittel treten nicht auf.

Gestalt und Abmessungen der benutzten Modellpartikel sind in Abb. 1 widergegeben. A bis O bestanden aus Buchenholz. A bis N sollten sich in der Gestalt (unter Berücksichtigung der Eigenschaften des Holzes als Werkstoff) an Krystallformen anlehnen. O (feine Buchenholzsägespäne) sollte ein Sediment aus besonders kleinen Teilchen darstellen. P war als Modell für Gelflocken aus Seidensäckchen, die lose mit Sägespänen gefüllt waren, angefertigt. Q bestand aus handelsüblichen Glasperlen, R als Modell mit ebenfalls besonders kleinen Partikeln aus Seesand.

Als Sedimentationsgefäß diente für alle Versuche ein Meßzylinder von 5,6 cm lichter Weite und 38 cm Höhe mit Teilung von je 10 ml, auf den ein

Trichter mit unten gleich weiter Öffnung aufgesetzt wurde. Der Sedimentationsvorgang erfolgte durch Einschütten unter Wirkung der Schwerkraft in Luft; dann wurde mit einem Stempel, der genau in den Zylinder paßte, von Hand in Richtung der Längsachse des Zylinders ein so starker Druck ausgeübt, daß die Modelle im Sedimentationsraum ein starres System bildeten. So wurden zusätzliche Hohlräume, die nicht durch die Lagerungsart der Partikel bedingt sind, vermieden. Die Unterkante des Stempels diente als Ablesemarke.

Bezeichnung	A	B	C	D	E	F	G	H	J
Form	Würfel	Würfel	dreikantige Prismen	quadratische Prismen	quadratische Prismen	rechteckige Prismen	achteckige Prismen	achteckige Prismen	achteckige Prismen
Maße in mm	$a = 9{,}5 - 10{,}6$	$a = 5{,}5 - 6{,}4$	$a = 9{,}9 - 11{,}2$ $h = 6{,}2$	$a = 4{,}7 - 5{,}8$ $h = 11{,}0$	$a = 5{,}6 - 6{,}0$ $h = 20{,}0 - 21{,}0$	$a = 3{,}3 - 3{,}7$ $b = 6{,}0$ $h = 11{,}5 - 12{,}5$	$a = 10{,}0 - 11{,}5$ $h = 11{,}0$	$a = 10{,}5 - 11{,}5$ $h = 6{,}0 - 6{,}6$	$a = 6{,}0 - 6{,}5$ $h = 19{,}0 - 20{,}0$
Anzahl in 200 g	305	1440	933	911	458	1294	268	469	502

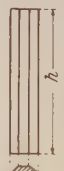
Bezeichnung	K	L	M	N	O	P	Q	R
Form	achteckige Prismen	 achteckige Prismen	Zylinder	Zylinder	feine Sägespäne	„Gel" (Sägespäne in Säckchenhülle)	$d = 5{,}83$ Glaskugeln	Seesand
Maße in mm	$a = 5{,}6 - 6{,}5$ $h = 11{,}0 - 11{,}3$	$a = 4{,}8 - 6{,}0$ $h = 36{,}2 - 38{,}6$	$d = 14{,}0 - 15{,}0$ $h = 5{,}2 - 6{,}8$	$d = 10{,}0 - 10{,}5$ $h = 5{,}2 - 5{,}8$				
Anzahl in 200 g	649	342	296	665	$\sim 5{,}5 \cdot 10^7$	42	2624 in 752 g	$4{,}2 \cdot 10^7$ in 773 g

Abb. 1. Modellpartikel.

Das Eigenvolumen V_k der aus Buchenholz bestehenden Teilchenmodelle wurde für je 200 g zu rund 300 ml ermittelt. Offenbar können dann auch die Glaskugeln Q und der Seesand R ebenfalls als Sedimentmodelle räumlich zum Vergleich herangezogen werden, wenn von ihnen Gewichtsmengen angewandt werden, die einem Volumen von 300 ml entsprechen. Diesem Volumen entsprachen 752 g Glaskugeln und 773 g Seesand. Das heißt anderseits, daß die verwendeten Volumina Q bzw. R, aus Buchenholz bestehend gedacht, ebenfalls 200 g wiegen mußten.

Versuchsmodell I: Eine Lösung enthält x Gramm eines Stoffes Y. Von dieser Lösung wird für jeden Versuch die gleiche Menge entnommen und in jedem Fall kann durch Zugabe eines Reagens die gleiche Menge eines chemisch identischen Niederschlages in Gestalt der Partikel A,

in jedem anderen Fall in Gestalt der Partikel *B* usw. ausgeschieden werden. Die Sedimentation erfolgt in allen Versuchen unter offensichtlich gleichen Bedingungen. (Hier: Schwerkraft, Zeit: 4 bis 5 sec)*.

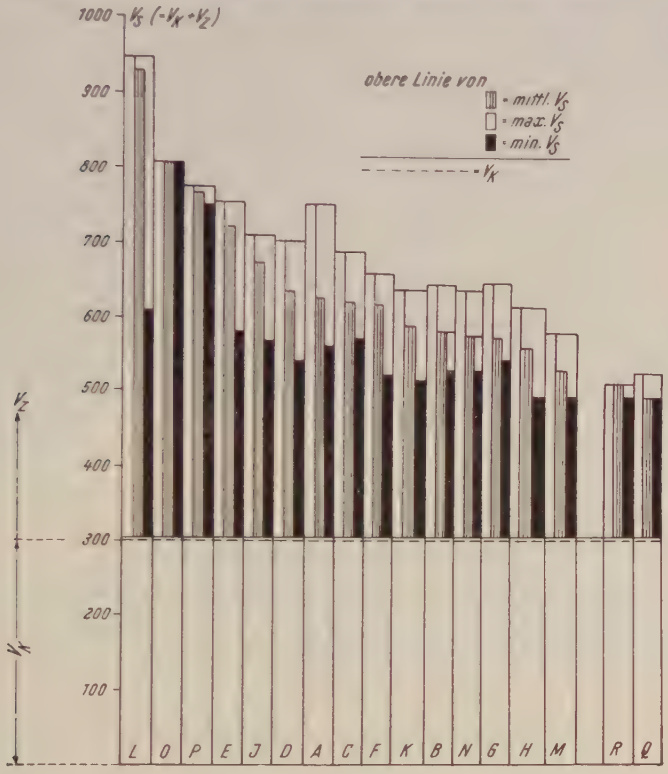


Abb. 2. Werte der Sedimentvolumina.

Tab. 1 gibt eine zahlenmäßige und Abb. 2 eine graphische Darstellung der Versuchsreihen (gestrichelte Säulen).

Ihre Auswertung ergibt folgendes:

Sedimentvolumen und Partikelgestalt.

Legt man der Betrachtung die Mittelwerte der Sedimentvolumina zugrunde, so ergibt sich, daß *Vs* je nach Gestalt der Partikel Werte zwischen 490 ml und 928 ml einnehmen kann. Die Sedimentvolumina können sich also bis zum Verhältnis 1 . 1,9 ändern, in Abhängigkeit von der Gestalt der vorliegenden Partikel. Es erhellt daraus der große Einfluß, den alle jene Faktoren in realen Systemen ausüben, die bei der Ent-

* Verlängerung der Sedimentationszeit wirkt sich durch etwas dichtere (geringeres V_s), Verkürzung durch lockere (größeres V_s) Lagerung der Teilchen aus.

Tabelle

	Partikel	*A*	*B*	*C*	*D*	*E*	*F*	*G*
	Anzahl (n) in 200 g bzw. 300 ml	305	1440	933	911	458	1294	268
1	Sedimentvolumen V_s	610	580	625	620	715	635	585
2		630	585	645	645	730	625	580
3		645	580	640	625	720	630	580
4		630	595	615	640	735	635	580
5		620	585	615	620	730	635	580
6		630	590	630	635	710	630	670
7		650	595	635	650	720	625	580
8		660	580	630	630	720	615	560
9		620	585	635	645	720	615	580
10		630	580	625	655	720	625	580
	Mittl. V_s	633	586	630	637	722	627	578
	Mittl. Abw. in % des Mittl. V_s ±	1,9	0,8	1,2	1,7	0,8	1,0	0,8

stehung der Niederschläge die Teilchen formen, also der Primärfaktoren sowie jenes Teiles der Sekundärfaktoren, die späterhin Änderungen der Partikel bewirken.

Eignung der Partikelgestalt und -zahl.

Die Sedimente, die unter gleichen Bedingungen keine oder nur geringe Verschiedenheit des Sedimentvolumens aufweisen, eignen sich gut, jene, die große Abweichungen zeigen, schlecht für die Heranziehung zu sedimetrischen Bestimmungen. Dementsprechend müssen auch die der Gesamtheit des Sediments zugrunde liegenden Partikel nach Zahl und Gestalt mehr oder weniger Eignung zur Ausbildung konstanter Sedimentvolumina besitzen. Bei den Modellen zeigt sich, daß die größten Differenzen bei der Form *A* (große Würfel) mit ± 1,9% auftreten, es folgt *D* (kurze quadratische Prismen) mit ± 1,7%. Um etwa 1% liegen *C*, *L*, *H*, *F*, *J*, *G*, *M*, *K*, *E*, *B*. Modell *N* (kleine flache Zylinder) erscheint mit ± 0,3% besonders günstig, während die Partikel *O* (Sägespäne), *Q* (Kugeln und *R* (Seesand) mit ± 0,0% ideale Konstanz bedingen.

Tabelle 2 zeigt den Zusammenhang zwischen Partikelgestalt, Anzahl und Abweichungen für einige Modelle:

Tabelle 2.

Gestalt	Würfel		flache Zylinder		Seesand	Späne
	A	*B*	*M*	*N*	*R*	*O*
Anzahl n ..	305	1440	296	665	$\sim 4{,}2 \cdot 10^7$	$\sim 5{,}5 \cdot 10^7$
Abweichung i. M. % ..	± 1,9	± 0,8	± 0,9	± 0,3	± 0,0	± 0,0

1.

H	*I*	*K*	*L*	*M*	*N*	*O*	*P*	*Q*	*R*
469	502	849	342	296	665	$\sim 5{,}5 \cdot 10^7$	42	2624	$\sim 4{,}2 \cdot 10^7$
560	565	580	910	530	585	810	770	490	510
550	670	605	905	530	580	810	770	490	510
565	689	595	935	530	585	810	770	490	510
565	680	600	930	550	585	810	770	490	510
570	675	600	935	520	580	810	770	490	510
570	665	595	930	525	585	810	760	490	510
570	675	600	940	530	585	—	750	—	—
570	690	605	935	530	585	—	760	—	—
550	665	600	910	535	585	—	740	—	—
565	680	600	945	530	585	—	740	—	—
564	675	598	928	531	584	810	760	490	510
1,1	1,0	0,8	1,2	0,9	0,3	0,0	1,3	0,0	0,0

Bei der als ungünstig erscheinenden Würfelform bewirkt also eine Erhöhung der Anzahl (= bei gleichem Gewicht zugleich Verkleinerung) der Partikel auf nahezu das 5fache eine Verringerung der mittleren Abweichung auf weniger als die Hälfte, bei den flachen Zylindern die Erhöhung um mehr als das Doppelte eine Verminderung auf ein Drittel. Mit zunehmender Zahl der Teilchen (= s. o.) erreicht das Verhältnis des Zwischenvolumens V_z zum Eigenvolumen einen konstanten Wert:

$$V_z = a \cdot V_k \ (a = \text{Konstante})^1$$

und damit wird zugleich auch V_s ($= V_z + V_k$) direkt linear proportional V_k. Diese Bedingung ist für Partikel *R* und *O* hier so ideal erfüllt, daß bei den hohen Zahlen auch Abänderungen in den Gestalten der Partikel nicht mehr störend in Erscheinung treten. So fanden sich bei *R* zirka 70% rundliche Formen von 0,30 mm bis 0,05 mm Durchmesser. Der Rest bestand aus spitzen und scharfkantigen Bruchstücken von 0,70 mm bis 0,20 mm jeweils größter Länge. Modell *O* bestand zu 76% aus unregelmäßig geformten Teilchen von weniger als 0,27 mm größter Länge, nur 0,13% waren faserförmig mit Längen zwischen 6,0 mm bis 8,0 mm und 0,36 mm bis 0,54 mm Dicke. Die Abmessungen der übrigen Teilchen lagen zwischen den angegebenen Grenzwerten.

Bei der Auswahl der Niederschläge sind also für Zwecke der sedimetrischen Analyse solche anzustreben, die aus möglichst zahlreichen und möglichst kleinen Teilchen bestehen.

Offensichtlich ist aber außer dem Einfluß der „Großen Zahlen" an der mehr oder weniger zur Konstanz von V_s führenden Lagerung der Teilchen auch die Gestalt der Partikel in spezifischer Weise beteiligt. So

besteht z. B. das Sediment D (dreieckige Prismen) aus 911 Teilchen und weist eine Streuung von $\pm$ 1,7% auf, während M (große flache Zylinder) bei nur 296 Teilchen $\pm$ 0,9% und G (dicke achteckige Prismen) sogar bei nur 268 Partikeln nur $\pm$ 0,8% mittlere Abweichung zeigen. Das Auftreten ein und desselben Wertes der Streuung bei verschiedenen Teilchengestalten und -anzahlen bedeutet, daß sich die Gestalt des Sedimentteilchens, dessen n-faches das Gesamtsediment bildet, spezifisch um so besser eignet, je kleiner n ist (hier n in der Größenordnung von 10^1 bis 10^3). Entsprechend ist bei gleichem n jene Teilchengestalt am besten geeignet, deren Gesamtsediment die geringsten Abweichungen im Volumen zeigt. Zur Verdeutlichung dieses Verhaltens soll der „Spezifische Streuungsfaktor" F_s dienen, der für den Rahmen der vorliegenden Untersuchungen als das Produkt der Teilchenzahl n in $G = 200$ g (bzw. $V_k = 300$ ml) und der mittleren Abweichung Δ vom Mittelwert des Sedimentvolumens definiert sei:

$$F_s = n \cdot \Delta$$

Für einige der hier benutzten Modelle sind die Werte von F_s in Tabelle 3 zusammengestellt:

Tabelle 3.

Gestalt	n	Δ	F_s
P „Gelflocken"	42	1,3	55
G Prismen, achteckig, dick	268	0,8	214
M Zylinder, flach, groß	296	0,9	266
A Würfel, groß	305	1,9	580
N Zylinder, flach, klein	665	0,3	200
D Prismen, quadratisch	911	1,7	1549
C Prismen, dreieckig	933	1,2	1120
F Prismen, rechteckig	1294	1,0	1294
B Würfel, klein	1440	0,8	1152
Q Kugeln	2624	0,0	0

Von den starren Körpern besitzt also die Kugel ($F_s = 0$) die am besten spezifisch geeignete Gestalt. Durch besondere Eignung zeichnet sich ferner das deformierbare „Gelflockenmodell" ($F_s = 55$) aus[7]. Besonders ungünstig erscheinen Prismenmodelle D und F ($F_s = 1549$ bzw. 1294).

Sedimentvolumen und Lagerungsarten der Partikel.

Wenn die Teilchen eines Niederschlages sich bei jeder Sedimentation in der gleichen Weise lagern würden, so erhielte man ohne weiteres auch konstante Sedimentvolumina für die betreffende Partikelart. Abgesehen von kugelförmigen Teilchen ist stets gleichartige Lagerung nur mit verschiedenem *Wahrscheinlichkeitsgrad* zu erwarten. Die mittleren Ab-

weichungen von den mittleren Sedimentvolumina bedeuten zugleich einen Hinweis auf die Grade dieser Wahrscheinlichkeiten. Die tatsächlich in den Versuchsreihen auftretenden unterschiedlichen Werte für V_s lassen aber eine jeweils andersartige Lagerung erkennen. So finden sich z. B. bei A (s. Tabelle 1) u. a. 610, 630, 660 ml, was besagt, daß in diesem Fall die mit einer bestimmten Teilchenart erhaltenen Sedimentvolumina innerhalb von Grenzen variieren können, die im Verhältnis 1,1 : 1,0 stehen. Dieser unter gleichen Sedimentationsbedingungen sich bemerkbar machende „Lagerungsfaktor" $F_L = \frac{V_{s\,\max.}}{V_{s\,\min.}}$ bedingt gegebenenfalls erhebliche Unsicherheiten bei einer Anwendung der Sedimente zu ana-

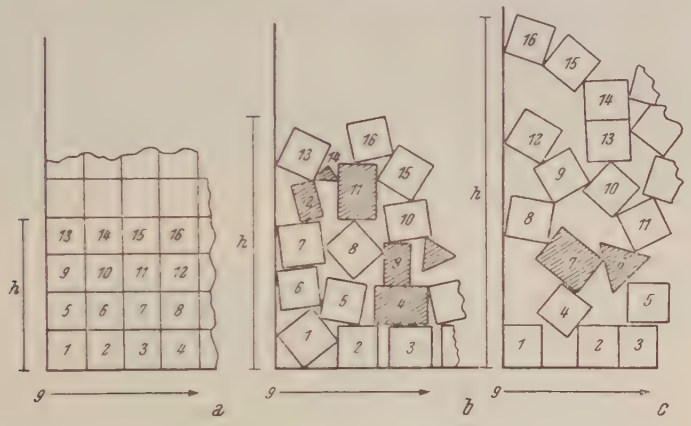


Abb. 3. Schema definierter Lagerungen.

lytischen Bestimmungen. Wie schon aus dem vorhergehenden ersichtlich, nimmt er nur bei kugelförmigen Teilchen und bei sehr großen Partikelzahlen den Wert 1 an. Für die übrigen, aus einer beschränkten Zahl von Teilchen bestehenden Sedimente erhebt sich nun die Frage, ob es möglich ist, zu eindeutig definierten Lagerungsarten zu gelangen.

Eine solche wohldefinierte Lagerungsart besteht in einer geordneten, z. B. der mathematisch dichtesten Packung, wie sie in Abb. 3 schematisch für würfelförmige Partikel in senkrechtem Schnitt unter a) dargestellt ist. Es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß bei den meisten Teilchenformen unter den Bedingungen der Praxis das Zustandekommen dieser Lagerungsart äußerst unwahrscheinlich ist. Dagegen mögen zwei andere definierte Lagerungsarten, die ungeordnet dichteste b) und die lockerste Packung c) erzielbar sein*. Sowohl zur Erzielung des Minimal-V_s als auch des Maximal-V_s wird die Anwendung besonderer Sedimentiermethoden

* Von der Quadratform abweichende Querschnitte der Würfel sind schraffiert.

natürlich in der Regel unerläßlich sein*. Die so charakterisierten Grenz*volumina* sind mithin besonders wertvoll für die analytische Anwendung.

Da das Eigenvolumen V_k nach den vorliegenden Versuchsbedingungen konstant ist, muß für Minimal-V_s das Volumen des sich zwischen den Partikeln befindenden Mediums (Zwischenvolumen V_z) den (praktisch) geringsten Raum einnehmen, während für Maximal-V_s das Zwischenvolumen unter Benutzung der Partikel und der Wände des Sedimentierraumes als Bauelemente unter Bildung besonders zahlreicher und großer tragfähiger Hohlräume den Maximalwert annimmt. Gemäß

$$V_s = V_k + V_z$$

sind alle Unterschiede der Sedimentvolumina nur durch verschiedene Werte von V_z bedingt (vgl. Abb. 2).

Minimal- und Maximalvolumen.

Versuchsmodell II: Wie bei I, jedoch durch zusätzliche Wirkung äußerer Kräfte nach der Sedimentierung Umlagerung der Partikel bis zur Erzielung der ungeordnet dichtesten bzw. lockersten Packung.

Zur Feststellung der Minimalvolumina wurde der Zylinderinhalt nach der Sedimentierung durch häufiges wiederholtes Aufschlagen mit der Unterseite, Klopfen und Stempeldruck möglichst weitgehend zusammengepreßt. Um die Maximalvolumina zu erhalten, wurde der Zylinder mit den Modellkörpern durch lebhaftes Drehen, Schütteln und Schwenken so bewegt, daß größtmögliche Auflockerung eintrat. Dann wurde der Stempel eingesetzt und bis zu völliger Starrheit des „Niederschlages" eingedrückt, so daß nicht tragfähige Hohlräume nicht vorhanden waren. Die Versuchsreihen wurden soweit ausgedehnt, daß mit ausreichender Sicherheit die Erreichung der Grenzwerte gewährleistet war. Die Minimalwerte traten durchschnittlich in je zehn Versuchen dreimal, die Maximalwerte einmal auf*. Erstere lassen sich also besser reproduzieren, sind demnach für die vorgesehene analytische Anwendung erfolgversprechender.

Die erhaltenen Minimal-V_s und Maximal-V_s sind in Tabelle 4 zusammengestellt und im Diagramm, Abb. 2, wiedergegeben (schwarze und weiße Säulen).

Tabelle 4.

V_s	*A*	*B*	*C*	*D*	*E*	*F*	*G*	*H*	*I*
maximal	750	645	690	710	750	655	650	620	715
minimal	560	525	570	540	575	520	540	490	570

	K	*L*	*M*	*N*	*O*	*P*	*Q*	*R*
maximal	640	945	585	640	810	770	530	510
minimal	510	610	490	525	810	740	490	490

* Versuche hierüber sind zur Zeit im Gange.

Im allgemeinen zeigen die Werte eine positive Korrelation zu den mittleren V_s, jedoch sind auch einige Besonderheiten vorhanden. Z. B. ergab sich, daß das nach Versuchsmodell I erzeugte V_s der langen Prismen *L* auch gleichzeitig das Maximal-V_s enthielt, denn die zur Aufweitung vorgenommene Behandlung ergab stets dichtere Packungen. Die Würfel *A* zeigten besonders stark erhöhte Maximal-V_s, desgleichen die achteckig dicken Prismen *G*. In diesen Fällen war — bei völliger Festigkeit der Sedimentsäule — in auffälliger Weise das Auftreten besonders großer Höhlen zu beobachten. Bei den aus sehr zahlreichen Teilchen bestehenden Modellen *O* und *R* waren die Maximal-V_s völlig identisch mit den mittleren V_s. Offensichtlich kompensieren sich hier die für kleine Teile der Sedimente an sich vorhandenen verschiedenen Lagerungen so vollkommen, daß ohne weiteres für das gesamte V_s konstante Werte resultieren. Auch *P* (Gelmodell) ergab, trotz Bestehens aus nur 42 Teilchen, bei der Spezialbehandlung als Maximal-V_s nur solche Werte, die auch sonst bei der Sedimentationsart nach Versuchsmodell I auftraten. Dieses Verhalten dürfte durch die Deformierbarkeit bedingt sein.

Besonders stark verringert gegenüber den mittleren V_s ist das Minimal-V_s bei *L* und *E*. Hier war deutlicher Übergang zu geordneten Lagerungen wahrnehmbar. Nahezu identisch mit den V_s nach Versuchsmodell I waren die Minimal-V_s bei *P* und *R*, während sie bei *O* und *Q* übereinstimmten. Weiterhin läßt sich erkennen, daß gewisse Teilchenformen, z. B. *L*, *E* und *J* bei der gewöhnlichen Sedimentation einer lockeren („sperrigen"), andere wie z. B. *A*, *G* und *M* einer dichten Packung zustreben. Bemerkenswert ist fernerhin, daß das absolut geringste Sedimentvolumen, welches sich erzielen ließ, nämlich 490 ml, bei mehreren Teilchenformen auftrat: Bei *H* (flache achteckige Prismen), *M* (flache Zylinder), *R* (Sand) und den Kugeln *Q*.

Eine Anwendung des Lagerungsfaktors (S. 1033) auf die Grenzwerte der Lagerungen für einige Teilchenarten zeigt Tabelle 5:

Tabelle 5.

	A	*D*	*G*	*J*	*L*	*O*	*P*	*Q*	*R*
F_L	1,34	1,31	1,20	1,25	1,55	1,00	1,03	1,08	1,04

Auch aus diesen Zahlen geht hervor, daß man, wenn man weitgehend auch nur die *Möglichkeit* von Differenzen der Sedimentvolumina auszuschalten bestrebt ist (die sich besonders auch bei etwa unerkannten Variationen der Sedimentationsbedingungen auswirken würden) Niederschläge mit einem F_L von möglichst = 1,0 (z. B. *O*, *P*, *Q*, *R*) hervorrufen

* Für *Q* aber regelmäßig.

muß. Die ausgeführten Modellversuche zeigen, daß sedimentierte Niederschläge, bestehend aus untereinander gleichen Partikeln, nur in besonderen Fällen die Bedingung

$$V_z = a \cdot V_k \text{ bzw. } \frac{V_k}{V_s} = p \ (a \text{ bzw. } p = \text{Konstanten}),$$

die für das ständige Auftreten konstanter Sedimentvolumina im Hinblick auf analytische Anwendung unerläßlich ist, erfüllen. Diese Bedingung ist gegeben:

1. Bei sehr großem n (Partikelzahl).
2. Bei kleinem n:

a) bei Partikeln von besonders günstiger spezifischer Eignung (z. B. Kugelform, Gelflocken).

b) bei Erzeugung charakteristischer Lagerungsarten:

α) Dichteste Packung (Minimal-V_s).

β) Lockerste Packung (Maximal-V_s).

Eine weitere Möglichkeit, die durch variable V_z hervorgerufenen Unsicherheiten zu eliminieren, ergibt sich noch dann*, wenn nicht die Bestimmung von V_s, sondern die von V_k der Volumenbestimmung direkt zugrunde gelegt werden könnte**. In den beschriebenen Modellversuchen war es leicht möglich, V_k zu bestimmen (= 300 ml). Daher konnten auch die Anteile von V_z an den einzelnen V_s und der Faktor $p = \frac{V_k}{V_s}$ als Verhältnis des als kompakt gedachten Volumens des Niederschlages ($= V_k$) zum diskontinuierlichen, aufgeweiteten ($= V_s$) angegeben werden.

In Tabelle 6 sind die V_z-Werte (s. Abb. 2) sowie die Faktoren p einiger Partikelarten verzeichnet:

Tabelle 6.

	A	*B*	*G*	*H*	*L*	*M*	*O*	*P*	*Q*	*R*
max. V_z	450	345	350	320	645	285	510	470	230	210
min. V_z	260	225	240	190	310	190	510	440	190	190
$Fp_{\text{max.}V_s}$	0,40	0,47	0,46	0,48	0,32	0,51	0,37	0,39	0,57	0,59
$Fp_{\text{min.}V_s}$	0,54	0,57	0,56	0,61	0,49	0,61	0,37	0,41	0,61	0,61

Wie ersichtlich, steht bei den Versuchen mit den Modellpartikeln der Anteil des wahren, von dem eigentlichen Sedimentkörper eingenommenen Volumens V_k zum „porösen" Volumen ($V_k + V_z = V_s$) im Verhältnis von 0,32 : 1,00 bis 0,61 : 1,00. Der letztere Faktor, der sich in

* Unter der Voraussetzung, daß Proportionalität zwischen V_k und Gewicht des zu bestimmenden Stoffes besteht.

** Über entsprechende Versuche wird in einer späteren Arbeit berichtet werden.

gleicher Größe für vier verschiedene Partikelarten ergibt, und zwar für H, M, R und Q beim minimalst erreichbaren V_s-Wert nach

$$V_s\ (490\ \text{ml}) = V_k\ (300\ \text{ml}) + V_z\ (190\ \text{ml}),$$

entspricht bemerkenswerterweise dem Verhältnis, wie es bei der einfachen hexagonalen Kugelpackung auftritt:

Einfache Kugelpackung	6	Nachbarn	je	Kugel	$V_k : V_s$	$= 0{,}524$
Einf. hexagon. Kugelpackung	8	„	„	„	„	$= 0{,}605$
Versetzte hexagon. Kugelpackg.	10	„	„	„	„	$= 0{,}695$
Hexagon. dichteste Kugelpackg.	12	„	„	„	„	$= 0{,}740$

Bei den Sedimentationen mit den Kugeln Q bildet sich also nicht die mathematisch dichteste Packung aus, anderseits entspricht die experimentell erzielte ungeordnet dichteste Packung bei den Partikeln H (flache achteckige Prismen), M (flache Zylinder) und R (Sand) ebenfalls dieser Art der Kugelpackung. Es darf daher vermutet werden, daß der Faktor $Fp = 0{,}61$ auch in der praktischen Sedimetrie eine besondere Bedeutung erlangen könnte, nämlich dann, wenn sich erweisen würde, daß sich auch unter den hierbei vorliegenden Bedingungen für eine bestimmte Menge eines aus definierten Teilchen bestehenden Niederschlages ein absolut geringstes V_s erzielen läßt*.

Sedimentvolumen bei zwei verschiedenen „Kristallformen".

Bei den vorstehend beschriebenen Versuchen war angenommen worden (mit Ausnahme der Partikel O, P, R), daß das Sediment aus untereinander gleichen Teilchen erzeugt wurde. Bekanntlich läßt sich aber diese Bedingung praktisch nach den bei realen Systemen vorliegenden Beobachtungen nur äußerst schwer verwirklichen, da die Ausbildung eines bestimmten Partikelhabitus trotz anscheinend gleicher Versuchsbedingungen nicht gewährleistet ist. Um auch über die bei verschieden gestalteten Teilchen sich räumlich bemerkbar machenden Einflüsse Hinweise zu erhalten, wurden im folgenden noch Versuche mit Mischungen von Modellpartikelchen ausgeführt:

Versuchsmodell III: Wie bei Versuchsmodell I, jedoch wurden Mischungen bestimmter Modellteilchen mit 40% und 60% je einer Art (zum Teil auch mit 20% und 80%) als entstandener Niederschlag vorgesehen. Unter natürlichen Bedingungen werden homogene Verteilungen

* Mathematisch müßte für nichtkugelförmige Partikel zwar bei gewissem Habitus die Möglichkeit einer noch dichteren Packung ($Fp > 0{,}61$) bestehen, jedoch können anscheinend die im Zustand der „idealen dichtesten Unordnung" gepackten Teilchen der Vergrößerung von Fp über 0,61 hinaus sehr großen Widerstand entgegensetzen.

nur als Grenzfall, z. B. bei sehr schneller Sedimentation im Sediment auftreten. Im allgemeinen werden die unteren Schichten vorwiegend die größeren (bei gleicher Dichte), die oberen vorwiegend die kleineren Teilchen enthalten. In

Versuchsmodell IV wurde daher der Grenzfall untersucht, daß eine geschichtete Sedimentation erfolgt.

In Tabelle 7 sind die nach beiden Versuchsmodellen erhaltenen mittleren V_s und mittleren Abweichungen verzeichnet, in Abb. 4 die mittleren V_s graphisch dargestellt (je zehn Versuche in jeder Reihe).

Tabelle 7.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Partikel „x“ % =	40 *B*	60 *B*	40 *B*	60 *B*	40 *G*	60 *G*	40 *N*	60 *N*
Partikel „y“ % =	60 *A*	40 *A*	60 *M*	40 *M*	60 *M*	40 *M*	60 *M*	40 *M*
V_s Schicht ml								
oben x unten y	598	584	544	547	543	556	544	538
mittl. Abw. % ±	0,6	0,8	0,8	0,5	0,9	1,1	0,6	0,5
V_s homogenes Gemisch $x + y$ ml	575	571	531	544	529	549	528	535
mittl. Abw. % ±	0,8	1,3	0,9	0,9	1,3	0,8	0,9	0,6

	9	10	11	12	13	14	15	16
Partikel „x“ % =	40 *K*	60 *K*	40 *F*	60 *F*	40 *O*	60 *O*	40 *C*	60 *C*
Partikel „y“ % =	60 *L*	40 *L*	60 *E*	40 *E*	60 *E*	40 *E*	60 *H*	40 *H*
V_s Schicht ml								
oben x unten y	768	676	668	664	661	677	579	580
mittl. Abw. % ±	1,6	1,1	1,7	1,2	1,0	0,9	0,6	0,4
V_s homogenes Gemisch $x + y$ ml	722	642	630	638	602	613	556	563
mittl. Abw. % ±	1,2	0,8	0,6	1,6	1,0	0,6	0,7	0,6

Aus Tabelle 7 ist ersichtlich, daß beim Vorliegen von nichteinheitlichen Niederschlagsteilchen keineswegs die Abweichungen größer werden als bei untereinander identischen Partikeln (± 1,7% bei Versuchsreihe 11, vgl. dazu Tabelle 1, Versuchsreihen *A* mit ± 1,9%, *D* mit ± 1,7%). Allerdings ist bei diesen Versuchen die Bedingung erfüllt, daß das Verhältnis der Partikelarten zueinander konstant ist. Vergleicht man jedoch, wie dies auch in Abb. 5 schematisch geschehen ist, Mischungen bzw. Schichtungen gleicher Teilchenarten, aber verschiedenen Mengenverhält-

nisses, so entstehen — bei gleichem Gesamt-V_k — zum Teil erhebliche Differenzen in den V_s. Es folgt daraus eindeutig, daß für die Erzielung möglichst konstanter V_s das Entstehen gleichartiger Partikel unwesentlich ist, daß aber, wenn ungleiche Partikel sich bilden, die einzelnen Arten dieser Teilchen zueinander immer in demselben Mengenverhältnis stehen

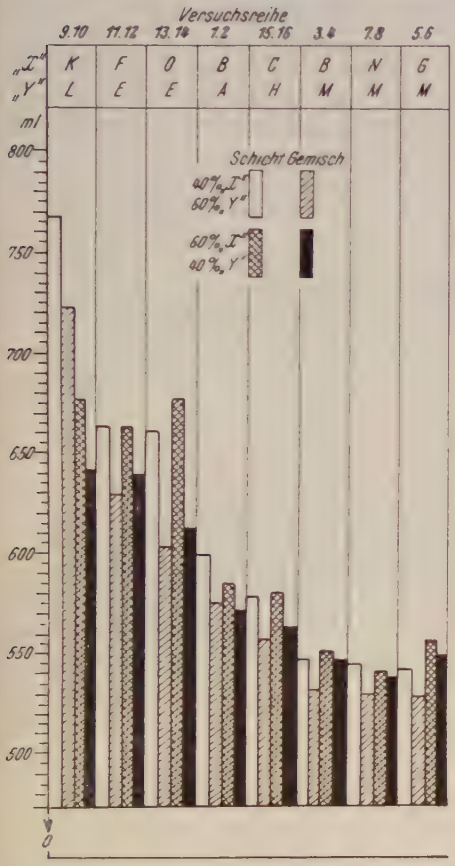


Abb. 4. Mittlere Sedimentvolumina bei Schichtungen und Gemischen ungleicher Partikelarten.

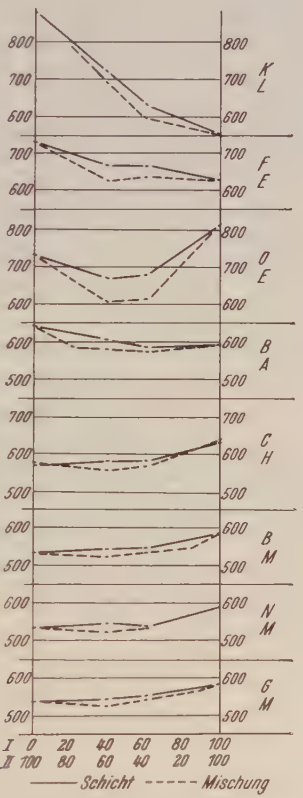


Abb. 5. Mittlere Sedimentvolumina bei wechselnden Anteilen der Partikelarten.

müssen. Ferner wird erkennbar, daß die homogenen Mischungen ein geringeres Volumen besitzen als die geschichteten (aus mehreren Partikelarten bestehende Sedimente müssen also besonders zu beachtenden Einflüssen bei Variationen der Sedimentationsbedingungen unterliegen) und daß Mischungen in der Regel, Schichtungen gelegentlich ein noch geringeres V_s ergeben können als die Komponente, die von beiden Teilchenarten (bei gleichem V_k) für sich allein das geringere Sedimentvolumen

einnimmt. Es tritt also eine „Verdichtung" des „Sedimentvolumens" (= Verringerung von V_z) ein*.

In den vorstehend beschriebenen Modellversuchen läßt sich ein Abbild im räumlich vergrößertem Maßstabe der Niederschlagsbildung und des Sedimentationsprozesses erblicken. Es ist zu erwarten, daß auch natürliche Systeme in ähnlicher Weise in bezug auf die räumlichen Faktoren sich verhalten. Dabei werden sich zusätzliche Faktoren, wie z. B. Festigkeit, Elastizität, Reibung, Adhäsion und Kohäsion, weiterhin bemerkbar machen. Ein eingehendes systematisches Studium dieser und weiterer physikalischer und chemischer Primär- und Sekundärfaktoren erst wird es ermöglichen, zu völliger Klarheit über die funktionellen Beziehungen zwischen dem Gewicht und dem Sedimentvolumen eines Stoffes zu gelangen.

Zusammenfassung.

Die quantitativen Beziehungen zwischen dem Gewicht eines aus einer Lösung als Bestandteil eines Niederschlages abgeschiedenen Stoffes und dem Sedimentvolumen sind außer von chemischen und sonstigen physikalischen Faktoren insbesondere auch von räumlichen Faktoren abhängig. In Versuchen mit räumlich vergrößerten Partikelmodellen wurde die Abhängigkeit des Sedimentvolumens von der Gestalt und der Anzahl der Teilchen studiert. Die „spezifische Eignung" zur Erzielung reproduzierbarer Sedimentvolumina ist durch die Partikelgestalt wesentlich bedingt, die möglichen Lagerungsarten der Teilchen bewirken die Veränderlichkeit des Zwischenvolumens. Definierte Packungsarten erlauben die Erzielung einer einfachen Proportionalität zwischen Gewicht und Volumen. Für eine Reihe von Raumfaktoren werden die Einflüsse bestimmt.

Summary.

The quantitative relations between the weight of a material deposited from a solution as a component of a precipitate and the volume of the sediment are dependent not only on chemical and other physical factors but also particularly on spatial factors. The dependence of the volume of the sediment on the shape and number of the particles was studied in trials with specially enlarged particle models. The "specific suitability" for the attainment of reproducible sediment volumes is fundamentally conditioned by the particle form; the possible varieties of arrangement of the particles produce the variability of the interstitial volume. Defined methods of packing permit the attainment of a simple proportionality between weight and volume. The influences were determined for a series of space factors.

* Untersuchungen über die Bedingungen für die Erzielung eines möglichst geringen „Porenvolumens" sind von großer Bedeutung z. B. in der Silikat- und Metallkeramik, Zement- und Kunststoffindustrie usw. Vgl. u. a. *Andreasen* und *Andersen*[8].

Résumé.

Les rapports quantitatifs entre le poids d'une substance séparée d'une solution comme constituant d'un précipité et le volume du sédiment, dépendent, en dehors des facteurs chimiques et physiques, tout particulièrement des facteurs stériques. Dans les recherches avec des modèles de particules agrandis dans l'espace, on a étudié la relation entre le volume sédimentaire et le nombre des particules. «L'aptitude spécifique» pour l'obtention des volumes de sédiments reproductibles est principalement déterminée par la taille des particules; les modes de superposition possibles des particules produisent le changement du volume intermédiaire. Des modes d'empilement définis permettent l'obention d'une proportionnalité directe entre le poids et le volume. On détermine les influences pour une série de facteurs stériques.

Literatur.

[1] *H. Chomse*, Monatsh. Vet. Med. **5**, 159 (1950). Daselbst auch weitere Literaturangaben.
[2] *K. L. Wolf*, Die Chemie **57**, 44 (1944).
[3] *Emma Wolffhardt*, Chem. Ber. **80**, 64 (1947).
[4] *G. Briegler*, Z. angew. Chem. **62**, 262 (1950).
[5] *A. Lüttringhaus*, Z. angew. Chem. **59**, 228 (1947).
[6] *L. Bragg* und *I. F. Nye*, Naturwiss. **34**, 328 (1947).
[7] *H. Chomse*, Z. angew. Chem. **59**, 245 (1947).
[8] *A. H. M. Andreasen* und *J. Andersen*, Kolloid-Z. **50**, 217 (1930).

Macaulay Institute for Soil Research, Aberdeen, Scotland.

The Spectrographic Determination of Trace Elements in Rocks, Minerals and Soils.

By

R. L. Mitchell.

(Received July 18, 1950.)

At the Macaulay Institute for Soil Research, we are interested in the determination of trace elements in the range of materials from the rock and its constituent minerals to the soil, the plant, the animal, and even its bacterial population. The trace elements present in soils are of importance in the nutrition of both plants and animals. Plants are known to be susceptible to deficiencies of Cu, Zn, Mn, Mo and B and to excesses of these elements as well as to many other metals such as Ni, Pb, Sn and Cr. Cu and Co are among the elements essential to animals. Co is needed particularly by ruminants at a level of about one part in ten million in the oven dry herbage, and it may indeed be the rumen bacteria that utilize this element[1]. Mo and Se in quite small amounts are toxic to animals.

It is for this reason that we attempt to determine as many of the trace elements as possible in soil and its parent materials, and in plants and animal substances. For the determination of one or perhaps in some instances even two metals at the parts per million level a colorimetric or other microchemical determination is probably most convenient, but when more elements are required, the author has no doubt that the spectrochemical approach is the most satisfactory. For work of this nature a spectrograph with adequate dispersion, such as the large quartz, is essential in order to obtain separation of the trace element lines from those of iron which is an inevitable major constituent of soils and rocks. To determine the total contents in such materials we employ the cathode layer arc technique developed initially by *Mannkopff*[2] for *Goldschmidt* in Göttingen. In this method[3, 4] the finely powdered sample is mixed with its own weight of carbon powder and filled into a narrow carbon

electrode with a deep narrow boring. Only 3–4 mg of sample are employed and this is consumed by burning for 3 minutes in a 9 amp. direct current arc, with the sample as the cathode. This method allows the detection of many trace elements at a level of one to ten parts per million, but a few such as zinc and tungsten are less sensitive. A semi-quantitative assessment against standard plates in a spectrum comparator gives an accuracy of $\pm$ 30–50% and produces results such as those in Table 1. Generally for our purpose it is adequate to know the total content of such materials to within $\pm$ 50%, as this has enabled us to correlate the content of many elements in a soil with its geochemical origin. Typical analyses of igneous rocks are seen in Table 2.

The data in Table 2 show the variation found in the fractional crystalization of a magma — the Skaergaard magma from Greenland[5]. The rocks become progressively less basic (i. e. with more silica) on passing from left to right, and the systematic trace element variations are quite obvious. These can be correleted with the ionic sizes of the constituents of the minerals, Co and Ni, for instance, taking the places of Fe and Mg in ferromagnesian minerals.

If greater accuracy is required, a determination to within $\pm$ 10% can be obtained by quantitative measurement of spectral line density by means of a microphotometer, using iron as internal standard[6, 7]. This requires a modified optical system with a step sector to give spectrograms suitable for quantitative measurement. In work of this nature, it is essential to ensure that the major composition of standard and unknown samples is closely comparable, otherwise quite appreciable errors can arise[8].

We are most interested at present in the exact determination of the easily soluble or "plant-available" content in soils, as this gives a better indication of what the plant can take up and pass to the animal. To determine the trace elements extracted from soils by dilute acetic acid or other extractants, and also the total trace elements in plant and other biological materials after ashing and sodium carbonate fusion, we have developed a precipitation technique with mixed organic reagents to effect concentration followed by spectrographic analysis. This method, which may be of general interest to microchemists in view of its possible applications in other directions, involves the use of 8-hydroxyquinoline, tannic acid and thionalide (β aminonaphthalide of thioglycollic acid). To an HCl solution of about 150 ml containing the trace elements, together with Al equivalent to about 30 mg Al_2O_3 and Fe to 1–5 mg Fe_2O_3 are added 15 ml of 5% 8-hydroxyquinoline in 2 N acetic acid, then 1 : 1 NH_4OH (17% NH_3) dropwise until a yellow to emerald green colour change at p_H 1,8. This colour change is due to the presence of iron and is less definite with high phosphate content. 30 ml 2 N ammonium

acetate are now added to buffer the solution to p_H 5.1 followed by 2 ml freshly prepared 10% tannic acid in 2 N ammonium acetate and after stirring, 2 ml freshly prepared 1% thionalide in glacial acetic acid; this is followed immediately by 25 ml of an ammonium hydroxide solution equivalent to the 2 ml glacial acetic acid. After standing overnight the precipitate is filtered and ashed at 450° C. Many trace elements at the 2–100 γ level, in the presence of Al_2O_3 are completely precipitated by these reagents. Table 3 shows the use of 8-hydroxyquinoline alone and Table 4 the mixed reagents.[7] Amounts of Co, Ni, Mo, Sn, Pb, Cr, V, Ti, Be and Ge in the 2–100 γ range can be determined simultaneously with combined chemical and spectrographic errors within $\pm$ 10%. Zinc is somewhat less sensitive by the spectrographic method employed, so that our figures cover a greater amount. Table 5 illustrates the type of results obtained from plant material, the last 5 figures (for Cu, Ba, Sr, Fe and Mn) being obtained directly from spectrographic analysis of the ash.[9]

Table 1. Trace Element Contents of 3 Typical Soils from North East Scotland, as parts per million.

Element		Sensitivity	Soil derived from:		
			Granite	Norite	Sandstone
Rb	7800.2	20	600	30	200
Li	6707.8	1	7	20	50
Ba	4934.1	5	2000	1000	700
Sr	4607.3	10	300	500	200
Cr	4254.3	1	5	50	200
Sc	4246.8	10	—	20	10
Mn	4030.8	10	700	2000	500
Co	3453.5	2	—	30	18
Ni	3414.8	2	10	15	60
Zr	3392.0	10	2000 ?	150	300
Zn	3345.0	300	—	—	—
La	3337.5	30	30	—	30
Y	3327.9	30	30	—	30
Ag	3280.7	1	—	—	—
Cu	3274.0		10	10	40
V	3185.4	5	20	300	100
Mo	3170.3	1	—	—	—
Be	3131.1	10	—	—	—
Ga	2943.6	1	25	20	20
Sn	2840.0	5	—	—	—
Pb	2833.1	10	20	—	—
Tl	2767.9	50	—	—	—
Ge	2651.2	10	—	—	—

A dash indicates a content less than the sensitivity quoted

For determinations of K, Na and Ca in soil extracts and plant materials we employ a flame photometer with a *Lundegardh* type burner and a wavelength spectrometer to isolate the Na and Ca lines and filters and an infra red image converter for K, detection in all cases being by photomultiplier tubes feeding spot galvanometers without amplification[10]. Simultaneous readings are obtained for all 3 elements and standard deviations of known solutions are within $\pm$ 1.5%. This method is applicable to total alkalis in rocks and soils, after the initial stages of the *Lawrence Smith* extraction.

Table 2. Trace Elements in the Rocks of the Skaergaard Intrusion, Greenland as parts per million.

Differentiates of the Skaergaard Magma.

	Ionic radius A.	Increasing acidity							Initial Magma
		A	B	C	D	E	F	G	
(Al···)									
Ga···	0.62	12	23	15	20	20	40	30	15
Cr···	0.64	700	175	—	—	—	—	3	300
V···	0.65	170	225	400	15	—	—	12	150
(Fe···)									
Li·	0.78	3	2	3	3	15	25	12	3
(Mg··)									
Ni··	0.78	600	135	40	—	—	5	5	200
Co··	0.82	80	55	40	40	5	10	4	50
Cu··		70	80	175	400	200	500	20	130
Sc···	0.83	7	20	15	10	—	—	—	15
(Fe··)									
Zr····	0.89	40	35	25	20	100	500	700	40
(Na·)									
Y···	1.16	—	—	—	—	125	175	200	—
(Ca··)									
La···	1.22	—	—	—	—	—	25	150	
Sr··	1.27	200	700	450	700	450	500	300	
(K·)									
Ba	1.43	25	25	45	50	150	450	1700	40
Rb	1.49	—	—	-	-	—	30	200	—

Table 3. Recovery of Trace Elements after Concentration with 8-hydroxyquinoline.

Present γ	Found				
	Co	Ni	Mo	Cr	V
2	2.1	2.2	2.3	—	—
5	5.8	5.8	5.0	—	3.3
10	10.1	10.7	9.6	3.3	6.6
20	20.4	21.7	19.2	7.6	12.8
50	46.5	55.8	45.0	19.6	30.6

γ	Be	Ge	Sn	Pb	Ti	Present mg	Found Zn
4	—	—	—	—	4.8		
10	—	—	7.7	—		0.2	0.21
20	—	13.0	14.0	—	20.4	0.4	0.40
40	—	18.0	23.0	8.3	44.0	2.0	2.04
100	—	23.0	46.0	14.5		4.0	4.26
200					220.0		
400					408.0		

Table 4. Recovery of Trace Elements after Concentration with 8-hydroxyquinoline + tannic acid + thionalide.

Present γ	Found				
	Co	Ni	Mo	Cr	V
2	1.9	2.1	2.3	2.0	2.1
5	5.1	5.4	5.0	5.0	5.0
10	9.9	10.9	9.7	9.4	9.8
20	18.9	20.9	20.0	19.1	19.9
50	51.6	55.0	45.0	51.4	46.6

γ	Be	Ge	Sn	Pb	Ti	Present mg	Found Zn
4	4.6	6.5			4.4		
10	10.2	10.7	11.8				
20	19.6	20.5	21.5	21.5	21.7	0.2	0.22
40	40.9	40.6	43.0	38.3	44.0	0.4	0.41
100	106.5	116.8	115.2	104.5		2.0	2.03
200					217.0	4.0	4.06
400					430.0		

Table 5. Trace Elements in a Mixed Pasture Herbage and Three of its Constituent Species as parts per million oven dry matter.

	Co	Ni	Mo	Pb	Sn	Zn	Ti	V	Cr	Cu	Ba	Sr	Fe	Mn
Mixed	0.16	1.74	0.49	2.1	0.4	38	3.1	0.14	0.17	9.9	24	19	91	95
Cocksfoot	0.14	0.93	0.53	1.9	0.3	25	1.1	0.07	0.12	5.8	6	6	45	101
Rye Grass	0.20	1.38	0.32	1.8	0.3	33	2.3	0.11	0.12	6.0	24	12	50	59
Red Clover	0.26	2.82	0.35	2.3	0.4	92	2.2	0.12	0.14	17.5	50	66	88	56

Summary.

The total content of trace elements in rocks, minerals and soils is determined by a semi-quantitative *cathode layer arc spectrographic* technique. For more accurate determinations *a variable internal standard technique*, in which the trace element contents are compared with that

of iron, is employed. This method is combined with a chemical concentration for the analysis of extracts of soils and plant materials. The chemical concentration technique involves the use of 8-hydroxyquinoline, tannic acid and thionalide, and gives recovery of microgram quantities of most trace elements, rejecting at the same time the alkalis, alkaline earths and phosphate.

Zusammenfassung.

Der Gesamtgehalt von Spurenelementen in Gesteinen, Mineralien und Bodenproben wird nach einem halbquantitativen Verfahren bestimmt; hiezu werden die Proben in gehöhlten, als Kathoden geschalteten Elektroden im Bogenstrom verbrannt. Für genauere Bestimmungen wird nach einem abgeänderten Verfahren der quantitativen Spektralanalyse die Menge des Spurenelementes der Probe in Bezug auf ihren Eisengehalt ermittelt. Diese Methode ist mit einer chemischen Anreicherung für die Untersuchung von Bodenextrakten und Pflanzenmaterial kombiniert. Die Technik der chemischen Anreicherung beruht auf der Verwendung von 8-Oxichinolin, Gerbsäure und Thionalid; auf diese Weise lassen sich Mikrogramme der meisten Spurenelemente ermitteln, bei gleichzeitiger Abscheidung der Alkalien, Erdalkalien und Phosphate.

Résumé.

La teneur globale des traces d'éléments dans les roches, les minéraux et les sols, est déterminée par une technique semi-quantitative, spectrographique d'arc à couche cathodique. Pour les dosages plus précis, on emploie une technique à étalon interne variable dans laquelle les teneurs en traces sont comparées à celles du fer. Cette méthode est combinée avec une concentration chimique pour l'analyse des extraits de sols et de végétaux. La technique de concentration chimique comporte l'emploi d'oxine, d'acide tannique et de thionalide et permet de récupérer des quantités de l'ordre du microgramme de la plupart des éléments en traces, ce qui élimine simultanément les alcalins, les alcalino-terreux et les phosphates.

Bibliography.

[1] *J. Tosic* and *R. L. Mitchell*, Nature, **162**, 502 (1948).
[2] *R. Mannkopff* and *C. Peters*, Z. Physik, **70**, 444 (1931).
[3] *R. L. Mitchell*, J. Soc. Chem. Ind., **59**, 210 (1940).
[4] *R. L. Mitchell*, The Spectrographic Analysis of Soils, Plants and Related Materials. Tech. Comm. No. 44, Commonw. Bur. Soil Sci. (1948).
[5] *L. R. Wager* and *R. L. Mitchell*, Min. Mag., **26**, 283 (1943).
[6] *A. M. M. Davidson* and *R. L. Mitchell*, J. Soc. Chem. Ind., **59**, 213 (1940).
[7] *R. L. Mitchell* and *R. O. Scott*, Spectrochim. Acta, **3**, 367 (1948).
[8] *R. O. Scott*, J. Soc. Chem. Ind., **64**, 189 (1945).
[9] *V. C. Farmer*, Spectrochim. Acta **4** (in press).
[10] *R. L. Mitchell*, Spectrochim. Acta **4**, 62 (1950).

Anstalt für Anorganische Chemie der Universität Basel.

Fossile Kohlenwasserstoffe und Farbstoffe in Kalksteinen.

(Geochemische Untersuchungen III.)

Vorläufige Mitteilung.

Von

M. Blumer.

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

Im Verlaufe der letzten Jahre hatte ich Gelegenheit, an der Anorganischen Anstalt der Universität Basel Sedimentgesteine auf ihren Spurengehalt an seltenen Elementen zu untersuchen. Es zeigte sich, daß auch in nicht bituminösen Gesteinen sehr kleine Mengen von organischen Verbindungen vorkommen. Bei der Isolierung und Charakterisierung dieser oft außerordentlich geringen Substanzmengen haben sich die mikrochemischen Arbeitsmethoden ausgezeichnet bewährt. Im folgenden werde ich über die Isolierung von Kohlenwasserstoffen und Farbstoffen ans einem Fossil des Oberen Juras berichten.

Im unteren Malm (unteres Rauracien = Glypticien) des nordwestschweizerischen Juras kommen an einigen Fundstellen (z. B. Fringeli, S. Laufen und Liesbergmühle) fossile Seelilien der Gattung Millericrinus vor. Sie zeichnen sich oft durch außerordentlich intensive Rot- bis Blauviolettfärbung der meist großen, verzahnten Kalzitzwillinge der Wurzelstöcke und Stielglieder aus. Auf Bruchflächen sind gelegentlich grüne, metallisch schillernde Anflüge zu erkennen. Eingehende Untersuchungen zeigten, daß es sich bei den färbenden Einlagerungen um einen kristallisierten fossilen Farbstoff handelt. Im Verlaufe der Aufarbeitung größerer Gesteinsmengen konnten außerdem auch ungefärbte kristallisierte Verbindungen isoliert werden, darunter ein hochkondensierter aromatischer Kohlenwasserstoff.

Im folgenden sei kurz der Weg der Aufarbeitung beschrieben: Die Fossilien werden vom Begleitgestein, einem blaugrauen, tonigen Kalk, soweit wie möglich befreit, zerschlagen, die reinsten Kalzitkristalle

Tabelle 1. Aufarbeitung von 10 kg fossilen Seelilien.

Kalzit	3,2 kg unrein	1,7 kg reiner	0,87 kg rein
Rückstand nach Lösen in HCl	115 g	17,2 g	5,3 g
Benzolextrakt	140 mg	18,4 mg	26,6 mg
Glühverlust des Rückstandes	11,3 g	3,5 g	4,1 g

ausgelesen und diese und das übrige Gestein gesondert in starker Salzsäure aufgelöst. Man verdünnt, läßt das Unlösliche absitzen, dekantiert und wäscht mehrmals; der Rückstand, der die organischen Bestandteile enthält, wird bei 110° getrocknet. Durch Benzolextraktion im Soxhlet gewinnt man ein öliges, intensiv blau fluoreszierendes, praktisch farbstofffreies Substanzgemisch; erst mit Aceton oder besser Pyridin wird das Gemisch der roten Farbstoffe herausgelöst. Über die Aufarbeitung von 10 kg Seelilien orientiert Tab. 1.

Die Kohlenwasserstoffe.

Zur Isolierung der Kohlenwasserstoffe werden die Benzolextrakte in Petroläther aufgenommen und über Aluminiumoxyd (Brockmann I) chromatographiert. Die ersten Petrolätherfraktionen enthalten eine farblose bis leicht gelbe, nicht fluoreszierende Verbindung; ihr UV-Absorptionsspektrum ist in Abb. 1 dargestellt. Der Schmelzpunkt dieser Verbindung liegt bei 120,5 bis 121° (korr.), sie läßt sich bei 0,05 mm zwischen 165 und 175° (Badtemperatur) unzersetzt destillieren. Aus 2,5 kg reinen, ausgelesenen Kalzits wurden 9 mg dieser Chromatogrammfraktion erhalten. Eine nähere chemische Charakterisierung der Verbindung steht noch aus, nach der Stellung im Chromatogramm und dem UV-Spektrum könnte es sich um einen zyklischen Kohlenwasserstoff handeln, der dem Naphthalin nahesteht.

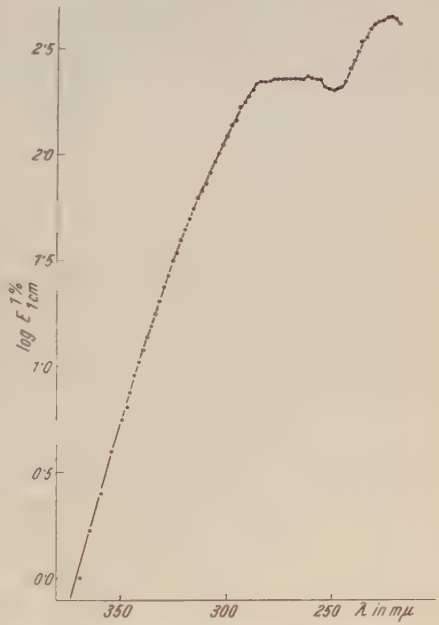


Abb. 1. UV-Absorptionsspektrum des Körpers aus dem Petroläthereluat, aufgenommen in Petroläther.

Petroläther mit 25 bis 30% Benzol eluiert eine in Lösung und auf der Säule intensiv blau fluoreszierende Fraktion. Beim Eindampfen gewinnt man daraus neben einem gelben Öl gelbe, rhomboedrische,

äußerst intensiv gelbgrün fluoreszierende Kristalle. Aus 2,5 kg reinen Kalzits wurden 12,4 mg dieser Fraktion isoliert. Die Verbindung löst sich wenig in Petroläther und Äthanol, mäßig in Benzol und gut in Chloroform. Die Lösungsfarbe in konz. Schwefelsäure ist rosa, sie geht jedoch bald nach oliv und braun über. Die Substanz läßt sich bei 0,01 mm und 220° unter teilweiser Zersetzung sublimieren. Beim Erhitzen auf

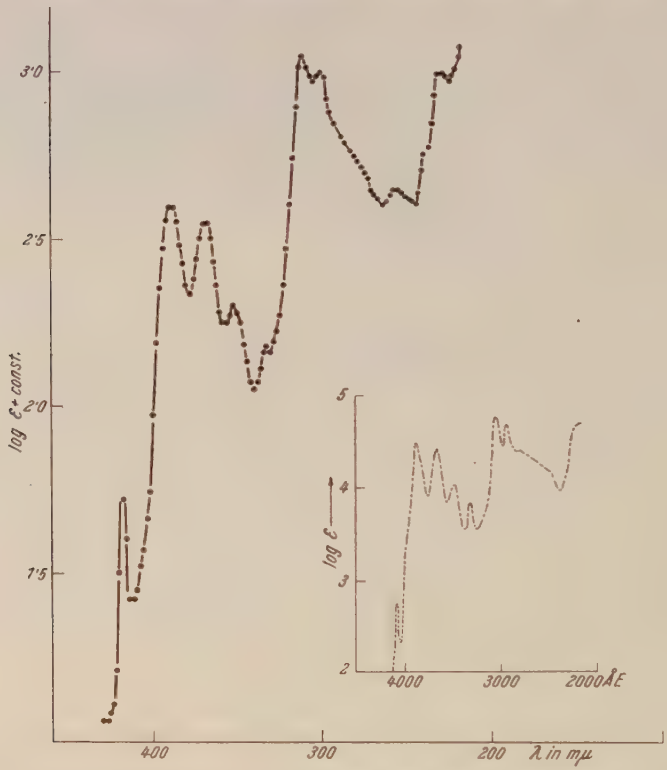


Abb. 2. UV-Absorptionsspektrum des 1,12-Benzperylenderivats, aufgenommen in Äthanol. Kurve rechts unten: Absorptionsspektrum des 1,12-Benzperylens in Benzol, ab 2800 Å in Äthanol nach *Clar*[2].

dem *Kofler*-Block zeigt die dreimal umkristallisierte Verbindung folgendes Verhalten: ab 200° allmähliche Verfärbung, ab 285° Sublimation, bei 310° haben sich große, klare Rhomboeder gebildet, von 326 bis 330° schmilzt das Sublimat, über 330° bilden sich an Deckglas und Objektträger neue, braune Kriställchen, die bis 450° ungeschmolzen bleiben.

Das Absorptionsspektrum (Abb. 2) zeigt das typische Bild eines kondensierten aromatischen Kohlenwasserstoffes und ist praktisch identisch mit demjenigen des 1,12-Benzperylens. Die neu isolierte Verbindung ist jedoch in ihren Eigenschaften deutlich davon verschieden

(Tab. 2). Herr Dr. *E. Clar* (Glasgow) hatte die große Freundlichkeit, mir bei der Deutung des Spektrums behilflich zu sein. Nach seiner Ansicht dürfte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Alkylderivat des 1,12-Benzperylens handeln.

Tabelle 2. Vergleich der Eigenschaften von 1,12-Benzperylen nach *Clar*[2] mit denjenigen des neu isolierten 1,12-Benzperylenderivats.

	1,12-Benzperylen	KW aus Pä, 25% Bz
Aussehen	Platten, j-gr	Rhomboedr. Platten, j-gr
Fluoreszenz	*	j-gr
Fluoreszenz in org. Lm.	bl	bl
Farbe in H_2SO_4	smaragdgrün	rosa—oliv—braun
Smp.	273°	326—330° (Zers.)

Die Farbstoffe.

Beim Betrachten eines Dünnschliffes der intensiv violett gefärbten Stielglieder der Seelilien stellt man fest, daß die färbende Verbindung in Form von außerordentlich kleinen, stäbchenförmigen Kristallen und etwas größeren, unregelmäßigen Aggregaten in dem ungefärbten Kalzit eingelagert ist. Löst man den Kalzit mit Salzsäure, so verbleibt neben geringen Mengen von Quarz, Pyrit und Tonmineralien der unveränderte Farbstoff; durch nachträgliches Behandeln mit heißer Flußsäure läßt er sich von Quarz und Ton befreien. Der Pyrit bleibt dabei erhalten, was die Aufnahme eines Röntgendiagramms der Kristalle bis jetzt verhinderte. Im zurückbleibenden Farbstoff lassen sich mikroskopisch die kleinen, länglichen Kristallstäbchen neben rundlicheren Kristallen feststellen, die in keiner Richtung eine vollständige Auslöschung ergeben und wahrscheinlich Aggregate der kleinen Kristalle sind. Herr Dr. *Grütter* von der Mineralogischen Anstalt der Universität Basel hatte die Freundlichkeit, die in Tab. 3 zusammengestellten optischen Daten zu bestimmen; sie sind der Kleinheit der Kristalle und ihrer intensiven Färbung wegen unvollständig.

Tabelle 3. Eigenschaften des Fringelits.

Aussehen, makroskopisch: Feines schwarzes Pulver.

Aussehen, mikroskopisch: Sehr kleine längliche Kristallstäbchen, daneben mehr rundliche Kristalle, die in keiner Richtung eine vollständige Auslöschung ergeben und wahrscheinlich Aggregate der kleinen Kristalle sind. Daneben SiO_2.

Optische Daten der Stäbchen (bestimmt von Dr. *O. Grütter*): Anisotrope Kristalle, Auslöschung gerade oder sehr wenig schief, optisch negativer Charakter der Hauptachse, pleochroitisch. Brechungsexponenten: $n_{\gamma'}$ zirka 2,0, $n_{\alpha'}$ zirka 1,6$_4$. Doppelbrechung zwischen 300 und 400.

* Keine Angabe in der Lit.

Der kristalline fossile Farbstoff ist (z. B. nach der Definition von *Niggli*[1]) als Mineral zu bezeichnen, ich möchte dafür, nach einer der Fundstellen, den Namen *Fringelit* vorschlagen. Der Fringelit ist in organischen Lösungsmitteln schwer löslich, am besten noch mit intensiv roter Farbe in Pyridin. In konz. Schwefelsäure löst er sich verhältnismäßig leicht mit grüner Farbe und intensiv roter Fluoreszenz; auch

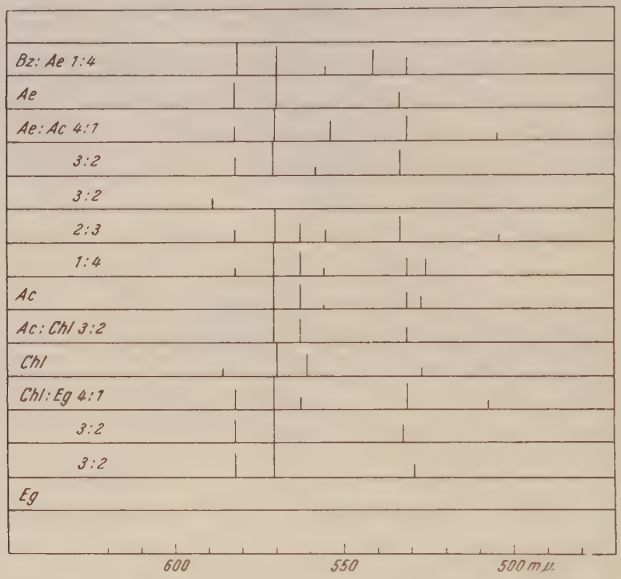


Abb. 3. Chromatogramm eines Farbstoffgemisches. 4 mg des acetylierten Farbstoffgemisches wurden aus Benzol-Petroläther auf 5 g sauren Aluminiumoxyds aufgezogen und mit je 5 ml der angegebenen Lösungsmittel eluiert. Nach Verseifung wurden die Spektren in Äther ausgemessen. Die Strichlänge entspricht qualitativ der Bandenintensität.

nach längerem Erwärmen auf 100° kann er daraus durch Verdünnen mit Wasser unverändert ausgefällt werden.

Bei der weiteren chemischen Bearbeitung zeigte es sich, daß nicht ein einheitlicher Farbstoff, sondern ein Gemisch mehrerer spektroskopisch und wahrscheinlich auch chemisch verwandter Farbstoffe vorliegt. Das rohe, aus dem Gestein isolierte Farbstoffgemisch ist praktisch stickstofffrei, in ätherischer Lösung weist es im sichtbaren Spektralgebiet zwischen 5000 und 6000 Å mehrere scharfe Absorptionsbanden auf, an denen bei der chromatographischen Aufarbeitung die Trennung verfolgt werden kann (Abb. 3). Die Farbstoffe lassen sich in Acetylderivate überführen, die Absorptionsbanden bei 2600 und 4200 Å aufweisen.

Zur Aufarbeitung wird das Farbstoffgemisch in Pyridin-Acetanhydrid acetyliert, mit Wasser gefällt, getrocknet und der benzollösliche Anteil der Acetylderivate extrahiert und anschließend auf ein schwach basisches

Aluminiumoxyd aufgezogen. Dabei werden die Acetylderivate augenblicklich verseift. Die farbstofffremden Bestandteile des Gemisches lassen sich dann eluieren. Der Farbstoff wird mit Pyridin abgelöst, reacetyliert und erneut, nun aber über ein mit Salzsäure vorbehandeltes und reaktiviertes, leicht saures Aluminiumoxyd chromatographiert. Dabei wurden mehrere kristallisierte Acetylderivate isoliert, über deren nähere Charakterisierung später berichtet werden soll. Ein weiteres Acetylderivat kristallisierte in einigen Fällen schon beim Acetylieren des Gemisches in langen gelben Nädelchen. Es ist sehr schwer löslich (zirka 350 mg in einem Liter siedenden Pyridins mit 7% Acetanhydrid) und läßt sich ebenfalls leicht zum Farbstoff verseifen. Die spektroskopische Charakterisierung dieses Farbstoffes war bisher nicht möglich, weil er in Äther unlöslich ist und die Spektren in geeigneten Lösungsmitteln (Eisessig, Pyridin) sehr unscharf sind. Eine Bestimmung des Molekulargewichtes der Farbstoffe oder Acetylderivate ist wegen der geringen Löslichkeit und intensiven Färbung bisher nicht gelungen.

Über die chemische Konstitution läßt sich einstweilen folgendes aussagen: Nach dem UV-Spektrum und einer Acetylbestimmung am letztbeschriebenen Acetylderivat dürfte es sich um Polyoxychinonfarbstoffe handeln. Die Analyse des Farbstoffgemisches spricht für einen höher kondensierten Grundkohlenwasserstoff. Im schwerlöslichen Acetylderivat könnte ein Tetraoxychinon mit 20 bis 22 C-Atomen vorliegen. Die OH-Gruppen sind außerordentlich schwach sauer, erst bei p_H 11 wird der Farbstoff der ätherischen Lösung entzogen, wobei das grüne Natriumsalz ausfällt. Eine so geringe Acidität der OH-Gruppen ist bei hochkondensierten Oxychinonen bekannt. Der Farbstoff konnte bisher nicht zu einem Leukofarbstoff reduziert werden, auch das spricht für die Anwesenheit eines höher kondensierten Systems. Umfangreiche Versuche zur Isolierung des Grundkohlenwasserstoffs durch Zinkstaubdestillation oder Zinkstaubschmelze nach *Clar*[2] oder Reduktion mit Zinkstaub und Eisessig in Pyridin nach *Clar*[3] schlugen fehl.

Über die Herkunft der Farbstoffe kann einstweilen noch nichts Sicheres ausgesagt werden, es ließe sich aber denken, daß es sich um Kondensationsprodukte des von *Kuhn* aus rezenten Seeigeln isolierten Echinochroms oder eines verwandten Farbstoffes handelt. Das in sehr kleiner Menge isolierte Benzperylenderivat wäre dann eventuell als endgültiges Reduktionsprodukt aufzufassen.

Die weitere Untersuchung dieser Probleme dürfte von biologischem Interesse sein, vor allem aber wertvolle Aussagen über die im Verlaufe der Bildung und Diagenese des beschriebenen Kalksteines vorherrschenden Umweltsbedingungen und chemischen Reaktionen ermöglichen. Besonders wichtig erscheint uns die Tatsache, daß organische Verbindungen nicht nur in Kohlen oder Bitumina erhalten bleiben können. Es sei darauf

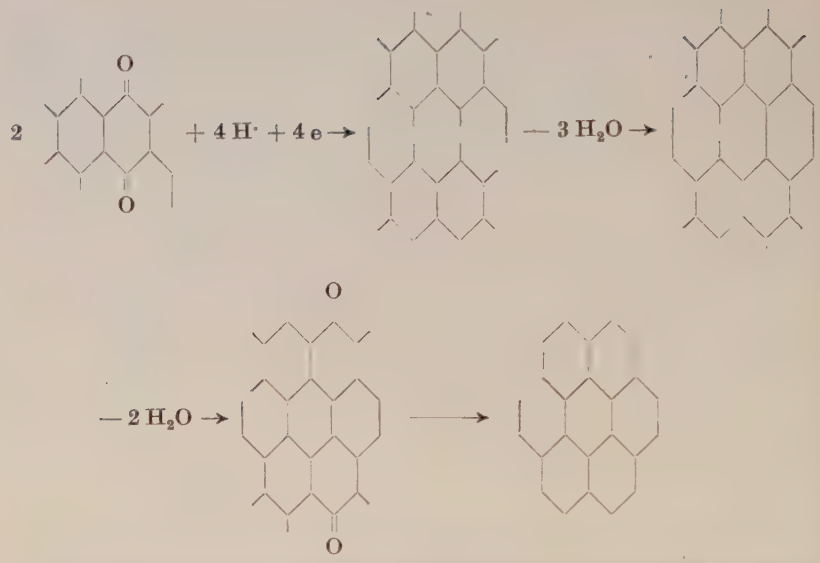


Abb. 4. Arbeitshypothese über die Entstehung der Farbstoffe und eines Alkylbenzperylens aus Echinochrom.

hingewiesen, daß nicht nur in den Seelilien fossile organische Verbindungen gefunden worden sind. Auch aus anderen in Kalksteinen vorkommenden Fossilien konnte ich kristallisierte organische Verbindungen isolieren, über deren Charakterisierung später berichtet werden soll.

Herrn Prof. Dr. *H. Erlenmeyer* danke ich für das große Interesse, das er dieser Arbeit entgegenbrachte.

Zusammenfassung.

Im Laufe der geochemischen Untersuchung von Sedimentgesteinen gelang die Isolierung geringer Mengen organischer Verbindungen aus fossilen Seelilien *(Millericrinus spec.)* aus dem unteren Malm des Berner Jura.

Es werden beschrieben: 1. Eine Verbindung unbekannter Struktur vom Fp. 120,5 bis 121°, möglicherweise ein aromatischer Kohlenwasserstoff. 2. Ein hochannelierter Kohlenwasserstoff, wahrscheinlich ein Alkylderivat des 1,12-Benzperylens. 3. Ein Gemisch mehrerer, chemisch nahe verwandter, fossiler Oxychinonfarbstoffe.

Im Gestein lassen sich mikroskopisch kleine Farbstoffkristalle feststellen; für das neue Mineral wird nach einer der Fundstellen der Name *Fringelit* vorgeschlagen.

Über die Entstehung dieser Verbindungen aus Echinochrom oder aus einem verwandten Naphthochinonfarbstoff wird eine Arbeitshypothese aufgestellt.

Summary.

In the course of the geochemical study of sedimentary rocks, small quantities of organic compounds were isolated from fossil sea lilies *(Millericrinus spec.)* from the lower malm of the Bernese Jura. The following are decribed: 1) a compound of unknown structure, m. p. 120,5—121° C, possibly an aromatic hydrocarbon; 2) a highly annelated hydrocarbon, probably an alkyl derivative of 1,12-benzperylene; 3) a mixture of several, chemically closely related fossil oxyquinone dyestuffs.

The stone was shown to contain microscopic small crystals; the name *fringelite*, from one of the places where the find was made, was proposed for the new mineral.

A working hypothesis was set up regarding the origin of these compounds from echinochrome or from a related naphthoquinone dyestuff.

Résumé.

Au cours de la recherche géochimique des roches sédimentaires, on arriva à l'isolement de faibles quantités de matières organiques à partir des lys de mer fossiles *(Millericrinus spec.)* de la couche inférieure de la mollasse du jurassique bernois. On décrit: 1° un composé de structure inconnue PF: 120,5—121°, probablement un hydrocarbure aromatique, 2° un hydrocarbure fortement polycyclique, probablement un dérivé alcoylé du benzopérylène-1,12, 3° un mélange de plusieurs colorants oxyquinoniques fossiles chimiquement voisins.

Dans la roche, de petits cristaux colorés se laissent observer microscopiquement: pour le nouveau minéral, on a créé le nom de *Fringelite* d'après le lieu de la découverte.

On a proposé une hypothèse de travail pour la filiation de ces composés à partir de l'échinochrome ou à partir d'un colorant naphtoquinonique de la même famille.

Literatur.

[1] *P. Niggli*, Gesteine und Minerallagerstätten, Bd. I, Basel, 1948, S. 15.
[2] *E. Clar*, Aromatische Kohlenwasserstoffe, Berlin, 1941, S. 73.
[3] *E. Clar*, Soc. **1949**, 2013.

Aus dem Institut für Mikrochemie und Geochemie der Technischen Hochschule Graz.

Zur kolorimetrischen Goldbestimmung*.

Von

H. Schreiner, H. Brantner und F. Hecht.

Mit 6 Abbildungen.

(Eingelangt am 8. Dezember 1950.)

Die bis jetzt verwendeten dokimastischen Methoden sind für die Untersuchung von Erzen mit verhältnismäßig großem Goldgehalt, Goldlegierungen usw. ausreichend genau. Für sehr geringe Goldmengen sind von verschiedenen Autoren mikrodokimastische Methoden ausgearbeitet worden, bei denen das am Ende erhaltene Goldkorn mikrometrisch ausgemessen oder auch gewogen wird[1]. Die Mikrobestimmung des Goldes ist jedoch nicht nur von geochemischer Bedeutung, sondern besitzt vor allem allgemeineres chemisches Interesse, u. a. in der Biochemie, Pharmazie und der Glastechnik, um nur einige Beispiele zu nennen.

Gold wird auch als organische Komplexverbindung genügend hoher Empfindlichkeit ausgefällt und, wie oben bei den mikrodokimastischen Verfahren angeführt, bestimmt[2]. Eine ausführliche Arbeit über die Bestimmung sehr geringer Goldmengen in Lebewesen ist von *J. Babička*[3] veröffentlicht worden; in ihr findet man auch zahlreiche Literaturnachweise, die sich auf Goldbestimmungen beziehen. *R. Strebinger*[4] und *W. Reif*[4] bestimmten schon vor längerer Zeit in einem alchimistischen Medaillon Kaiser Leopolds I. Gold durch Reduktion mit schwefeliger Säure. *W. Geilmann* und *O. Meyer-Hoissen*[5] bestimmten Gold mikrokolorimetrisch in gefärbten Gläsern. *L. Ebert* und *A. Dirscherl*[6] bedienten sich einer mikrovolumetrischen Methode für die Goldbestimmung in Goldoleosolen, die in der Therapie verwendet werden. *F. Hecht* und *G. Lamac-Brunner*[7] fanden, daß die mikrogravimetrische Methodik durch reduzierende Fällung des

* Die vorliegende Arbeit wurde von *H. Schreiner* am 22. November 1944 an der Technischen Hochschule in Graz als Diplomarbeit eingereicht und anschließend approbiert.

Goldes bei Mengen von wenigen Milligramm durchschnittlich auf etwa 1% genau ist*. Für kleinere Goldmengen empfiehlt sich daher eine mikrogravimetrische Bestimmungsmethode nicht mehr.

Wir versuchten unter Berücksichtigung der von den oben genannten Autoren gemachten Erfahrungen, ein mikrokolorimetrisches Bestimmungsverfahren auszuarbeiten, dessen Genauigkeit für Goldmengen von 10 bis 200 γ Gold (in einem Volumen von 100 ml) nicht geringer als etwa $\pm$ 5% sein sollte.

Für den qualitativen Goldnachweis sind von einer Anzahl von Forschern Farbreaktionen[8] angegeben worden, von denen wir hier nur wenige herausgreifen.

Das von *A. Trillat*[9] zuerst zum Nachweis von Blei und Mangan verwendete Reagens Tetramethyldiaminodiphenylmethan $CH_2[C_6H_4N(CH_3)_2]_2$ wurde von *R. J. Carney*[10] zum Nachweis und zur Bestimmung des Goldes und des Ammoniaks benützt (Grenzkonzentration 1:5000000, Blaufärbung). *J. A. Siemssen*[11] erhielt beim Versetzen einer 0,005%igen wäßrigen Goldchloridlösung (entsprechend 32 γ Au/ml) mit einer schwefelsauren m-Phenylendiaminlösung noch eine sofortige Violettfärbung (Grenzkonzentration 1:31000). Nach *J. E. Saul*[12] gibt p-Phenylendiamin mit Goldsalzlösungen eine empfindliche Farbreaktion (Grüngelbfärbung), wobei die Grenzkonzentration 1:1600000 ist. Das zum Nachweis des Silbers von *F. Feigl*[13] eingeführte Reagens p-Dimethylaminobenzylidenrhodanin kann auch zum Nachweis von Gold, Platin und Palladium verwendet werden[14] (Grenzkonzentration für Gold 1:500000). *G. Malatesta* und *E. di Nola*[15] verwendeten zum Goldnachweis eine essigsaure Benzidinlösung, womit sie eine Blaufärbung erhielten (Grenzkonzentration 1:50000). *H. Holzer* und *W. Reif*[16] beschrieben einen qualitativen Nachweis des Goldes mit α-Naphthylaminhydrochlorid, der schon von *R. Piria*[17] und *H. Schiff*[18] teilweise geprüft worden ist. Es soll auf diese Weise noch 1 γ Au/ml nachweisbar sein. *W. B. Pollard*[19] gebrauchte o-Toluidin $CH_3 \cdot C_6H_4 \cdot NH_2$ zum Nachweis von Gold. Die Grenzkonzentration der Gelbfärbung ist 1:20000000. *W. Geilmann* und *O. Meyer-Hoissen*[5] benützten das Reagens o-Tolidin zum Nachweis und zur Bestimmung des Goldes in Gläsern (Gelbfärbung). Eine genaue Bestimmung des Goldes, die auf einer Farbreaktion zwischen Goldchlorid und o-Dianisidin beruht, gaben *W. D. Block* und *O. H. Buchanan*[20] an. Danach gestattet die Methode die Bestimmung von 5 bis 300 γ Au/ml.

G. Milazzo[21] bestimmte Gold mikrovolumetrisch mit Hydrochinon, wobei o-Dianisidin als Indikator benützt wurde.

* Es treten aber auch, je nach der angewendeten Reduktionsmethode, Abweichungen von mehreren Prozent im Vergleich zum richtigen Wert auf.

Wir haben einige der vorstehend genannten Verfahren geprüft, soweit uns die betreffenden Reagenzien zugänglich waren* und die Reaktionen sich durch große Empfindlichkeit auszeichneten.

Experimenteller Teil.

I. Prüfung mehrerer Reagenzien auf ihre Eignung zur kolorimetrischen Goldbestimmung.

Wir verwendeten für unsere Untersuchungen ein lichtelektrisches Universalkolorimeter der Fa. Dr. B. Lange, Berlin.

1. Benzidin.

Eine Lösung von 1 g Benzidin in 10 ml 10%iger Essigsäure und 50 ml Wasser gibt mit verdünnten Goldlösungen, die mindestens 3,5 γ Au/ml enthalten, eine blaue Färbung. Mehr freie Essigsäure bewirkt einen Umschlag in Grün, doch geht die Färbung mit überschüssigem Benzidin wieder in Blau über. Verdünnte Platinsalzlösung erzeugt mit Benzidinacetat einen blauen flockigen Niederschlag. Die Reaktion wurde jedoch von uns nicht eingehender untersucht, da bei den Nachweisen mit Benzidin beträchtliche Schwierigkeiten hinsichtlich ihrer Eindeutigkeit auftreten können.

2. α-Naphthylaminhydrochlorid.

Gold und Palladium geben mit diesem Reagens violette bzw. gelbe Komplexverbindungen, Eisen hingegen oxydiert es unter Bildung eines violetten, eisenfreien Niederschlages. Nach dem Verglühen des Gold- bzw. Palladiumniederschlages findet man das Metall im Glührückstand, während Eisen darin nicht nachweisbar ist. Der Komplex Gold(I)-chlorid-α-Naphthylaminhydrochlorid hat die Formel $AuCl \cdot C_{10}H_7NH_2 \cdot HCl$ (berechneter Goldgehalt 47,8%), bzw. die Verbindung Palladium(II)-α-naphthylaminchlorid die Zusammensetzung $Pd[C_{10}H_7NH_2]_2Cl_2$. Es darf dabei nur in schwach saurer Lösung gearbeitet werden; stärkere Acidität verhindert die Reaktion. Die Färbung ist bis zu zwei Stunden haltbar.

Versuch: Normallampe mit Grünfilter; 100-ml-Küvette. Die 0,1%ige α-Naphthylaminhydrochloridlösung wird vorher mittels eines quantitativen Filters filtriert. 100 γ Gold geben drei Minuten nach Einlaufen des Reagens nach der „Ausschlagmethode"[21] die Extinktion $E = 0{,}072$, 800 γ Gold die Extinktion $E = 0{,}174$. Infolge des kleinen Extinktionskoeffizienten verläuft die Extinktions-Konzentrations-Kurve sehr flach, so daß keine große Genauigkeit zu erwarten ist. Mehr als 1 γ Au/ml läßt sich bei einer Schichtdicke von 34 mm (100-m-Küvette) mit dieser Farbreaktion nicht mehr bestimmen. Der Einfluß des Eisens kann durch Zugabe von fester Weinsäure oder Seignettesalz verhindert werden. Die Ausschaltung des Eisens als Tartratkomplex erfolgt allerdings auf Kosten der Empfindlichkeit der Goldreaktion. Bei Anwesenheit von Palladium geht die Färbung mehr ins Bräunliche über; reine Palladiumlösungen liefern einen gelben Farbton. Mit Pyridin kann man das Palladium komplex binden, so daß es nicht mehr mit dem Reagens reagiert und auch

* Die Arbeit wurde 1944 unter den schwierigen Verhältnissen des Krieges ausgeführt.

nicht die Goldfärbung beeinflußt. Doch sinkt dann die ohnehin nicht große Empfindlichkeit der Reaktion mit Gold gegenüber der Färbung ohne Zusatz von Pyridin.

3. p-Phenylendiamin.

Dieses Reagens bewirkt mit $AuCl_3$-Lösungen eine empfindliche grüngelbe Färbung. Sie erreicht zweieinhalb Minuten nach Hinzufügen des Reagens zur Probe das Intensitätsmaximum, das höchstens 20 Sekunden lang bestehen bleibt.

Versuch: 200 γ Au in sorgfältig von HNO_3 befreiter Lösung, 10 ml 0,1%ige p-Phenylendiaminhydrochloridlösung; Normallampe mit Blaufilter; 100-ml-Küvette; Ablesung nach zweieinhalb Minuten (vgl. Tabelle 1).

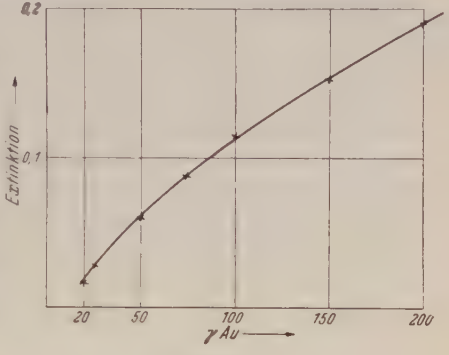


Abb. 1.

Die Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration des Goldes zeigt die Abb. 1. Die Ablesungen wurden nach jeweils zweieinhalb Minuten vorgenommen. Die Kurve weist eine Abflachung auf. Es wurden Goldkonzentrationen zwischen 20 und 200 γ Au 100 ml verwendet, doch waren die Extinktionen niedrig. Die Färbung entsteht nur in neutraler bzw. in schwach salzsaurer Lösung. Sie wird bei Gegenwart verdünnter Salpetersäure verhindert. Ist jedoch die Färbung bereits entstanden, so tritt durch Zugabe kleiner Mengen verdünnter Salpetersäure sofortige Entfärbung ein.

Tabelle 1.

Zeit in Minuten	1	2	2,5	3	4
Extinktion E	0,164	0,189	0,190	0,186	0,175

II. Die kolorimetrische Bestimmung des Goldes mit o-Tolidin.

A. Vorversuche.

Reagenslösung: Das Reagens o-Tolidin hat die Formel

1 g davon wurde in 1000 ml 10%iger HCl gelöst. Diese Konzentration hat sich als brauchbar erwiesen, da dann die Volumina der zugesetzten Reagensmenge im Vergleich zum Gesamtvolumen der zu kolorimetrierenden Lösungen günstig sind.

Goldlösung: Es wurde eine Stammlösung mit einem Gehalt von 1 mg Au/ml hergestellt. Das eingewogene Feingold, das von der Fa. W. C. Heraeus in Hanau/Main stammte, wurde in einer eben ausreichenden

Menge Königswasser gelöst. Die Lösung wurde auf dem Wasserbad einige Zeit in der Wärme stehen gelassen, dann in einen Kolben gespült und mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Durch Verdünnen dieser Stammlösung wurden Lösungen mit Gehalten von 500, 100, 50 und 10 γ Au/ml hergestellt.

Arbeitsweise: Für die ersten kolorimetrischen Messungen wurde die Goldsalzlösung in einem Tiegel aus Berliner Porzellan eingedampft. Der Rückstand wurde dreimal mit je 0,3 ml konz. HCl abgeraucht, damit nicht gegebenenfalls entstandenes Nitrit die Reaktion störe. Da sich bei diesem Vorgang jedoch sehr leicht elementares Gold ausscheidet, durfte die Flüssigkeit nicht bis zur völligen Trockne eingedampft werden. Falls dies dennoch der Fall gewesen war, mußte der Rückstand erneut in Königswasser gelöst und der Vorgang wiederholt werden. Dann wurde mit warmem Wasser aufgenommen, die Flüssigkeit in einen 100-ml-Meßkolben gespült und aus einer Pipette das Reagens zugesetzt. Nach Zugabe des letzten Tropfens wurde die Zeit gemessen, nach der die Ablesung des Absorptions- bzw. Extinktionswertes erfolgte.

Reagenszusatz: Um die zugegebene Reagensmenge zwar möglichst klein, aber doch ausreichend groß zu wählen, wurde der Zusatz ermittelt, der für die zu messenden *größten* Goldmengen erforderlich war. Die Arbeitsbedingungen waren: Normallampe mit Blaufilter, 100-ml-Küvette.

a) In der ersten Versuchsreihe wurde der Reagenszusatz zwischen 1 und 15 ml geändert. Die angewandte Goldmenge war stets 200 γ Au. Bei Zugabe von 1 ml war die Farbe grasgrün, bei 3 ml gelbgrün, bei 5 ml gelb; bei 8, 10 und 15 ml trat die Färbung sogleich ein, zeigte jedoch keine größere Intensität. Diese Meßreihe wurde bei Zimmertemperatur ausgeführt. Die Werte der Tabelle 2 bezeichnen das Absorptionsmaximum. Trotz der Änderung des Reagenszusatzes und der dadurch bewirkten Farbänderung blieb der durch das Blaufilter herausgefilterte Gelbanteil gleich (Tabelle 2).

Tabelle 2.

Reagensmenge in ml.	1	3	5	8	10
Farbe	grün	gelbgrün	gelb	gelb	gelb
Absorption in %	61,0	60,0	62,2	62,0	62,5
	60,0	59,0	62,6	62,4	62,2

b) In der zweiten Versuchsreihe betrug der Reagenszusatz stets 1 ml. Es wurden je 200 γ Au angewendet und die Extinktion bei Zimmertemperatur in aufeinanderfolgenden Zeitabständen von je 1 Minute gemessen. Der Küvettenfehler wurde durch Benützung stets derselben Küvette ausgeschaltet.

Die Färbung war anfänglich blaßgrün und erreichte nach 15 bis 18 Minuten das Absorptionsmaximum. Die Farbe war dann grasgrün und verblaßte bei längerem Stehen, bis die Lösung schließlich wieder farblos war. Zur Entstehung der vollentwickelten Färbung war ein Zeitraum von 14 bis 15 Minuten erforderlich (Tabelle 3).

Tabelle 3.

Zeit in Minuten	2	3	4	5	6	7
Absorption in Prozent	—	—	—	—	52,5	55,8
	30,4	40,0	45,0	49,6	53,4	55,4

Zeit in Minuten	8	9	10	11	12	13	14	15
Absorption in Prozent	57,6	58,8	60,0	60,5	61,0	62,0	62,4	62,4
	57,8	59,0	60,0	60,6	61,1	62,0	62,3	62,4

c) In der dritten Versuchsreihe war der Reagenszusatz nur 0,5 ml. Bei so kleinen Reagenszugaben wurde das Maximum der Färbung nicht erreicht, da nicht alles vorhandene Gold in Form des gelben Komplexes gebunden werden konnte. Nach 25 Minuten ging die Färbung wieder zurück, ohne den bei größeren Reagenszusätzen gemessenen Maximalwert der Extinktion erreicht zu haben.

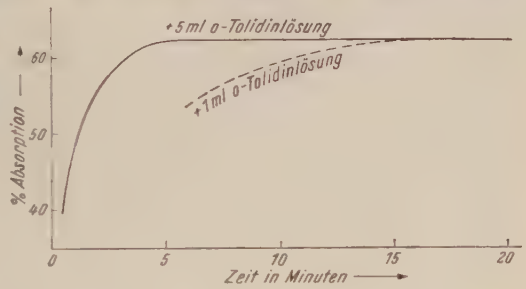


Abb. 2.

200 γ Au wurden bei Zimmertemperatur mit 0,5 ml Reagens versetzt. Die Färbung war nur schwach grünlich, da der Zusatz nicht ausreichte. Die Meßbedingungen waren dieselben wie beim vorhergehenden Versuch. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 enthalten.

Tabelle 4.

Zeit in Minuten	6	8	10	15	18	20	24	45
Absorption in Prozent	32,1	39,4	45,1	53,5	56,2	57,5	58,9	56,6

Das erreichte Absorptionsmaximum betrug also bei diesem Versuch nur 58,9%. Infolgedessen wurden alle folgenden Versuche mit der zehnfachen Reagensmenge, d. h. mit 5 ml o-Tolidinlösung ausgeführt. Dabei wurden gleichfalls je 200 γ Au angewendet. Die Ablesungen wurden nacheinander mit je 5 Minuten Abstand ausgeführt und entsprachen bei den ersten drei Bestimmungen 62,2%, 62,6% und 62,2% Absorption. Auf

diese Weise wurden schließlich insgesamt 10 Bestimmungen ausgeführt, um die Schwankungen bzw. die Reproduzierbarkeit zu prüfen. Die Abweichungen betrugen maximal $\pm 2{,}6\%$ einschließlich des Küvettenfehlers.* Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind zusammen mit denen der Tabelle 3 in der Abb. 2 dargestellt.

B. Goldbestimmung bei Abwesenheit von Fremdmetallen.

Auf Grund der vorstehend beschriebenen Ergebnisse konnte eine Eichkurve ermittelt werden (Abb. 3). Dabei wurde mit Normallicht und Normalblaufilter in der 100-ml-Küvette gearbeitet. Vor Zugabe der Reagensmenge (5 ml) wurde die Probe mit Eiswasser gekühlt. Die Abbildung zeigt zwei Eichkurven, von denen die eine die Reproduzierbarkeit nach einem Tag (jedoch nicht bei Eiskühlung, sondern bei 18° C) darstellt. Sie ist in ihrem Gesamtverlauf gegenüber der zuerst gewonnenen Eichkurve ein wenig verschoben.

Abb. 3.

Bei Verwendung der Normallampe mit Blaufilter können also 30 bis 200 γ Au bestimmt werden. Wegen der verhältnismäßigen Flachheit der Kurve wurde jedoch versucht, mit Quecksilberlicht einen steileren Anstieg zu erzielen.

Versuche mit Quecksilberlicht: Bei den im folgenden beschriebenen Versuchen wurden eine Quecksilberlampe und ein Quecksilberblaufilter benützt. Dadurch wurde die bestimmbare Goldkonzentration nach niedrigeren Bereichen ausgedehnt, und zwar erwiesen sich bei der Schichtdicke von 34 mm (100-ml-Küvette) noch 10 γ Au/100 ml als bestimmbar. Zwischen 10 und 65 γ Au/100 ml folgten die Extinktionswerte streng dem *Lambert-Beer*schen Gesetz.

Die Ablesungen erfolgten 5 Minuten nach Einlauf des letzten Reagenstropfens. Während des Zufügens der Reagensmenge wurde öfters durch-

* Drei verschiedene Küvetten zeigten folgende Extinktionen: 0 (Vergleichs-Küvette), 0,003 und 0,005. Dies beleuchtet die Zweckmäßigkeit, Serienbestimmungen stets in ein und derselben Küvette auszuführen.

geschüttelt. Die Quecksilberlampe wurde vor der Messung 5 Minuten lang einbrennen gelassen, um gleichbleibende spektrale Zusammensetzung des Lichtes zu erreichen. Vorschaltung eines Spannungsreglers war eine weitere Vorsichtsmaßnahme.

Die Meßwerte waren die Mittel aus sechs Reihenbestimmungen, die in Abständen von je drei Tagen ausgeführt wurden, um gleichzeitig die Reproduzierbarkeit überprüfen zu können (vgl. Abb. 4). Sie betrug $\pm 2\%$.

Wenn man 10 γ Au als noch bestimmbare Mindestmenge zugrunde legt, würde dies bei 1 g Einwaage eines Erzes 0,001% entsprechen.

Es sind also mit Normallicht 30 bis 200 γ Au 100 ml, mit Quecksilberlicht 10 bis 65 γ Au 100 ml meßbar. In einer Mikroküvette sind infolge der kleineren Schichtdicke auch größere Goldkonzentrationen als 65 γ Au/100 ml = 0,65 γ Au ml mit Quecksilberlicht bestimmbar.

C. Goldbestimmung bei Gegenwart unedler Metalle.

1. Neben Blei:

Zu der in einem Tiegel aus Berliner Porzellan befindlichen Goldsalzlösung wurde 1 ml einer $PbCl_2$-Lösung (1000 γ Pb/ml) zugefügt; hierauf wurden 0,3 ml konz. HNO_3 zugesetzt und der Tiegelinhalt auf dem Wasserbad eingedampft. Der Rückstand, der nicht lange trocken auf dem Wasserbad erwärmt werden darf, wurde mit konz. HCl einige Male eingedampft und zum Schluß mit warmem Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde in einen Meßkolben gespült, bei Zimmertemperatur mit 5 ml o-Tolidin versetzt und sodann bis zur Marke aufgefüllt. 5 Minuten nach Einlaufen des letzten Tropfens wurde in der 100-ml-Küvette die Extinktion gemessen (Tabelle 5). Die Abweichungen von der Eichkurve betrugen + 0,7 bis + 3,3% (Quecksilberlicht).

Tabelle 5.

Pb angewendet in γ	Au angewendet in γ	Extinktion E	Au gefunden in γ
1000	15	0,079	15,2
1000	15	0,082	15,5
1000	40	0,351	40,7
1000	40	0,356	41,0
1000	60	0,558	60,4
1000	60	0,573	61,7

2. Neben Quecksilber(II):

Quecksilber(II)-chlorid reagiert mit o-Tolidinlösung nicht. Die Blindprobe wurde mit 10 mg $HgCl_2$/100 ml ausgeführt und ergab mit 5 ml Reagens keine meßbare Extinktion ($E = 0{,}000$). Die Extinktionswerte

für Gold neben Quecksilber konnten also mit der Eichkurve für Gold allein verglichen werden. Messungen mit 45 γ Au und 5000 γ $HgCl_2$ lieferten die Extinktion $E = 0{,}390$, standen also in sehr guter Übereinstimmung mit der Eichkurve (Quecksilberlicht).

3. Neben Kupfer:

Größere Kupferkonzentrationen verursachen mit dem Reagens eine grüngelbe Färbung, doch beträgt die Extinktion bei 10 mg Cu/100 ml erst 0,002 (bei Quecksilberlicht). Um also Gold neben noch größeren Kupferkonzentrationen bestimmen zu können, müßte die Vergleichslösung mit einer gleich großen Kupfermenge versetzt werden.

4. Neben Cadmium (Zinn, Antimon, Wismut):

$CdCl_2$ reagiert mit o-Tolidin nicht, denn 10 mg Cd/100 ml wiesen die Extinktion $E = 0{,}000$ auf.

Versuche: 50 γ Au + 1000 γ Cd; $E = 0{,}460$ (Quecksilberlicht),
50 γ Au + 10000 γ Cd; $E = 0{,}452$.

Selbst noch größere Cadmiumkonzentrationen beeinflussen die Extinktion der Farbreaktion des Goldes nicht. Ebenso reagierten Sn(IV) und Sb(V) (in ähnlichen Konzentrationen) mit o-Tolidin nicht, während bei Sn(II), Sb(III) und Bi(III) infolge der großen Verdünnung ein Hydrolyseniederschlag entstand.

5. Neben Eisen:

Eisen ist in allen Mineralen in mehr oder minder großer Menge vorhanden, doch kann es auch im Verlauf des Arbeitsganges in geringer Menge aus den Reagenzien eingeschleppt werden. Bei einer dokimastischen Goldbestimmung geht das Eisen nicht in den Metallregulus über und ist deshalb in der Probelösung nur in sehr kleiner Konzentration vorhanden. Es kann jedoch vorkommen, daß in Proben mit großem Goldgehalt (Legierungen, Münzen, Schmucksachen), die in Königswasser gelöst werden und sogleich kolorimetriert werden sollen, merkliche Eisenmengen vorhanden sind, die den Goldwert sicherlich beeinflussen und fälschen würden. Eine Maskierung des Eisens ist also in den meisten praktisch vorkommenden Fällen unerläßlich. Dafür sind dreierlei Möglichkeiten denkbar:

a) Es könnte eine Fe-Konzentration ermittelbar sein, die mit dem Reagens noch keine meßbare Färbung gibt;

b) es könnte vielleicht durch Zusatz einer verhältnismäßig sehr großen Fe-Menge (z. B. 2000 γ Fe/100 ml) die schon vorhandene Fe-Konzentration „überdeckt" werden. Selbstverständlich müßte für diesen Fall eine besondere Eichkurve aufgestellt werden;

c) es wäre zu versuchen, das störende Eisen komplex zu binden bzw. in eine nur mehr schwach oder ganz ungefärbte Verbindung überzuführen, vorausgesetzt, daß die dazu benützten Reagenzien oder der neu entstandene Komplex nicht die durch Gold hervorgerufene Färbung stören. Die Beständigkeit des entstandenen Fe-Komplexes müßte jedenfalls so groß sein, daß er bei Gegenwart von o-Tolidin nicht wieder zerfiele.

Versuche zu a): Die verwendete Fe(III)-stammsalzlösung enthielt 1000 γ Fe/ml (in 0,05-n-HCl). Sie mußte chlorid- und nitritfrei sein. Dabei zeigte sich, daß Fe(III)-ion mit o-Tolidin reagiert. 200 γ Fe/100 ml erzeugten mit 5 ml Reagens eine mit der Zeit zunehmende Gelbfärbung (Tabelle 6).

Tabelle 6.

Zeit in Minuten	5	10	15	19	30	35
Extinktion E (Quecksilberlicht)	0,100	0,220	0,347	0,705	0,860	0,950

Die Färbung nahm noch weiter zu und verschwand nach einigen Stunden wieder. Da auch bei 50 γ Fe/100 ml eine starke Gelbfärbung entstand ($E = 0{,}100$), die als zusätzliche Färbung wirkte, war der Weg nach a) auszuschließen.

Bemerkung zu b): Da z. B. 1000 γ Fe/100 ml nach 5 Minuten eine Extinktion $E = 0{,}61$ geben, würde diese Gelbfärbung des Eisens neben der des Goldes den Hauptanteil der Extinktion ausmachen. Außerdem nimmt die Eisen-Farbreaktion im Augenblick dieser Ablesung noch so stark zu, daß die Messung schon aus diesem Grunde nicht ausführbar wäre.

Versuche zu c): Es wurde die Entfärbung des Eisens mit Phosphorsäure versucht. Bei einer Blindprobe verursachte 1 ml 85%iger H_3PO_4 mit 5 ml o-Tolidin keine Färbung ($E = 0{,}000$).

1000 γ Fe + 0,5 ml H_3PO_4 in 100 ml bewirkten die Extinktion $E = 0{,}000$,
5000 γ Fe + 0,5 ml H_3PO_4 in 100 ml bewirkten die Extinktion $E = 0{,}002$*.

Demnach sind 0,5 ml 85%iger H_3PO_4 ausreichend, um 1000 γ Fe/100 ml vollständig zu entfärben.

Goldbestimmung in Gegenwart von Phosphorsäure: Aus folgenden Versuchen ist ersichtlich, daß eine höhere Phosphorsäurekonzentration ohne Wirkung auf die Empfindlichkeit der Farbreaktion bleibt:

30 γ Au + 1 ml H_3PO_4 + 5 ml o-Tolidin; $E = 0{,}245$ (Quecksilberlicht),
60 γ Au + 1 ml H_3PO_4 + 5 ml o-Tolidin; $E = 0{,}556$ (Quecksilberlicht).

* Die Phosphorsäure wurde zu einem kleinen Volumen der Eisensalzlösung gegeben und erst dann die Lösung verdünnt.

Bei diesen Versuchen wurde die Goldsalzlösung wie bei den früheren Bestimmungen abgeraucht und nach Auflösen des Rückstandes in warmem Wasser mit 1 ml H_3PO_4 ($D = 1{,}710$) versetzt. Nach Auffüllen der Lösung auf 95 ml wurden noch 5 ml Reagens zugefügt.

Goldbestimmung neben Eisen und Phosphorsäure: Anfänglich wurde in einem Porzellantiegel die Goldsalzlösung zusammen mit der Eisensalzlösung abgeraucht. Bei dieser Arbeitsweise streuten aber die Extinktionswerte zu stark, was an der Schwierigkeit des Abrauchens (Spritzen) lag. Um diese zu vermeiden, wurde eine Gold-Stammlösung hergestellt, indem 4 ml einer $AuCl_3$-Lösung, die 500 γ Au/ml enthielt, von HNO_3 befreit und in einen 200-ml-Meßkolben gespült wurden. Die zur Marke aufgefüllte Stammlösung enthielt dann 10 γ Au/ml. Die geänderten Arbeitsbedingungen verursachten bei einigen Meßserien eine Parallelverschiebung der Konzentrations-Extinktionskurve. Innerhalb einer Serie fielen die Proben, bei denen Eisen zugesetzt und mit H_3PO_4 entfärbt worden war, mit den Extinktionswerten der reinen Goldlösungen zusammen. Die Reproduktion der Messungen in derselben Lösung an verschiedenen Tagen war mit Abweichungen von 1,5 bis 2,5% ausführbar. Die Tabellen 7 und 8 erläutern die Versuchsergebnisse näher.

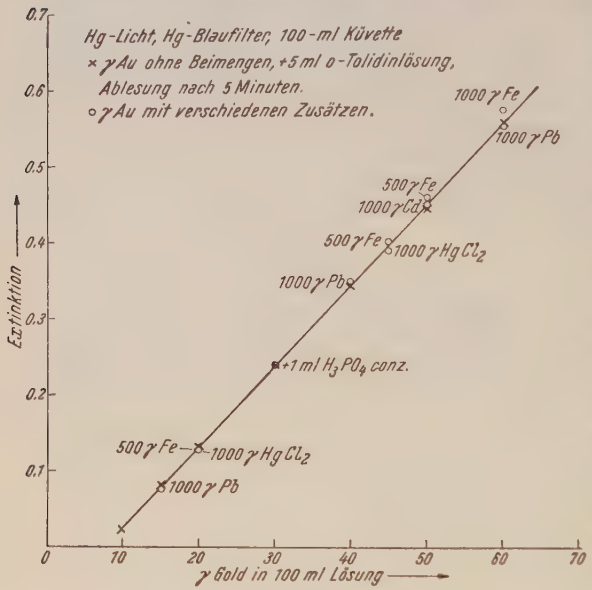


Abb. 4.

Tabelle 7.

Hg-Lampe; Hg-Blaufilter; 100-ml-Küvette; 5 ml Reagens.

Goldmenge in γ	15	20	30	35	50	60	75
Extinktion E . .	0,075	0,135	0,245	0,280	0,445	0,560	0,730

Tabelle 8.

Hg-Lampe; Hg-Blaufilter; 100-ml-Küvette; 5 ml Reagens; 0,5 ml H_3PO_4.

Goldmenge in γ . .	20	45	50	60	75
Eisenmenge in γ. .	500	500	500	1000	1000
Extinktion E.	0,138	0,405	0,465	0,580	0,750

Diese Werte sind in der Abb. 4 eingetragen, die auch Bestimmungen bei anderen Fremdzusätzen enthält.

Daneben wurde auch eine Bestimmungsreihe für Gold neben Eisen unter Benützung der Normallampe wiederholt: Abb. 5. Der brauchbare Meßbereich bei dieser gekrümmten Kurve erstreckt sich bis etwa 150 γ Au/100 ml. Bei größeren Goldkonzentrationen ist die Verwendung einer Mikroküvette mit kleinerer Schichtdicke anzuraten.

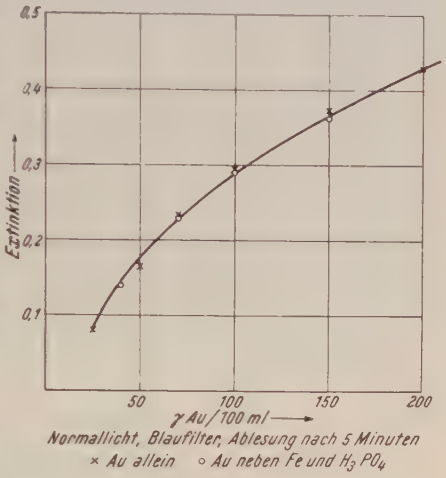


Abb. 5.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei sehr kleinen Eisenmengen eine geringe zusätzliche Färbung entsteht, die schon bei 20 γ Fe/100 ml an den Küvettenfehler heranreicht. Bei genauen Messungen muß daher das Eisenion, selbst wenn es in noch so kleiner Konzentration vorhanden ist, durch Entfärbung unschädlich gemacht werden. Dies geschieht mit Phosphorsäure, wobei die vorhandene Eisenmenge nicht genau bekannt zu sein braucht*. Wenn also Eisen in der Probe vermutet wird, fügt man stets 0,5 ml 85%iger Phosphorsäure zu. Die Probe wird dann in einem 100-ml-Meßkolben mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Quecksilberlicht ist dem Normallicht vorzuziehen.

6. Neben Aluminium:

$AlCl_3$ reagiert mit o-Tolidin nicht, so daß die Färbung, die das Gold mit dem Reagens gibt, nicht gestört wird. Die Blindprobe zeigte bei 1000 γ Al/100 ml die Extinktion $E = 0{,}000$.

Versuche: 35 γ Au + 500 γ Al; $E = 0{,}320$ (Quecksilberlicht),
55 γ Au + 500 γ Al; $E = 0{,}557$ (Quecksilberlicht).

7. Neben Nickel und Kobalt:

Selbst bei vorsichtigstem Abrauchen der Goldchloridlösung mit konz. HCl findet eine geringe Goldausscheidung statt. Diese Goldpartikelchen sind bei 200facher Vergrößerung unter einem Metallmikroskop bei auffallendem Licht als hellgelbe metallische Pünktchen erkennbar. Nitrit darf jedoch nicht zugegen sein, weil es sofort mit o-Tolidin eine anfangs dunkelbraune, jedoch alsbald in intensives Gelb übergehende Färbung erzeugt.

* Die Fe-Menge in der Probe darf dabei bis 2000 γ betragen (in 100 ml).

Auch Nitrate bzw. Salpetersäure verursachen in größeren Konzentrationen gleichfalls eine Gelbfärbung. Verdünnt man 0,5 ml konz. HNO_3 mit Wasser auf 95 ml, so entsteht mit 5 ml o-Tolidin eine kaum sichtbare Färbung ($E = 0{,}004$), während 1 ml konz. HNO_3 unter denselben Bedingungen eine Extinktion $E = 0{,}006$ bewirkt. Setzt man jedoch das Reagens vor dem Verdünnen zu der konzentrierten Säure und füllt erst nachher auf 100 ml auf, so entsteht eine merkliche Gelbfärbung: $E = 0{,}033$.

Da in der Praxis höchstens drei Tropfen (= etwa 0,1 ml) konz. HNO_3 vorhanden waren, war demnach der zur Goldabscheidung führende Vorgang des Abrauchens überflüssig. Bei allen folgenden Versuchen wurde deshalb eine gewogene Menge Feingold in Königswasser gelöst und die Lösung in einem Meßkolben aufgefüllt. Davon wurde eine Stammlösung mit einem Gehalt von 10 γ Au/ml bereitet, die den erlaubten Säuregrad nicht überschritt und sogleich zu kolorimetrischen Bestimmungen verwendet werden konnte. Infolge der ein wenig größeren Säurekonzentration fiel die Reaktion nunmehr etwas träger aus, so daß das Extinktionsmaximum erst nach rund 25 Min. erreicht wurde. Im übrigen bietet jedoch diese Arbeitsweise recht günstige Bedingungen (Tabelle 9).

Tabelle 9.

60 γ Au in HCl/HNO_3-saurer Lösung; Hg-Licht; Hg-Blaufilter; 100-ml-Küvette.

Zeit in Minuten	6	8	10	12	15	19	23	25
Extinktion E . .	0,505	0,520	0,528	0,538	0,563	0,598	0,608	0,606

Zeit in Minuten	28	30	32	35	39	46	50
Extinktion E . .	0,608	0,609	0,609	0,608	0,605	0,602	0,594

Die Genauigkeit der Reproduktion war bei dieser Arbeitsweise gestiegen. Nickel(II) und Kobalt(II) geben mit o-Tolidin keine Reaktion, wie folgt:

Blindproben: 500 γ und 1000 γ Ni; $E = 0{,}000$,
300 γ und 500 γ Co; $E = 0{,}000$.

Tabelle 10 erläutert die Versuche in Gegenwart von Nickel und Kobalt.

Tabelle 10.

Goldmenge in γ/100 ml	Nickelmenge in γ/100 ml	Kobaltmenge in γ/100 ml	Extinktion E
35	—	500	0,311
40	—	500	0,383
20	500	—	0,145
25	500	—	0,216
35	500	—	0,308

Es ist gleichgültig, ob die Metalle als Nitrate oder Chloride zugesetzt werden (vgl. Abb. 6).

8. Neben Mangan(II) und Zink:

Beide Metallionen erzeugen mit o-Tolidin keine Färbung (vgl. Abb. 6). Blindproben: Je 1000 γ/100 ml beider Metalle gaben die Extinktion $E = 0{,}000$.

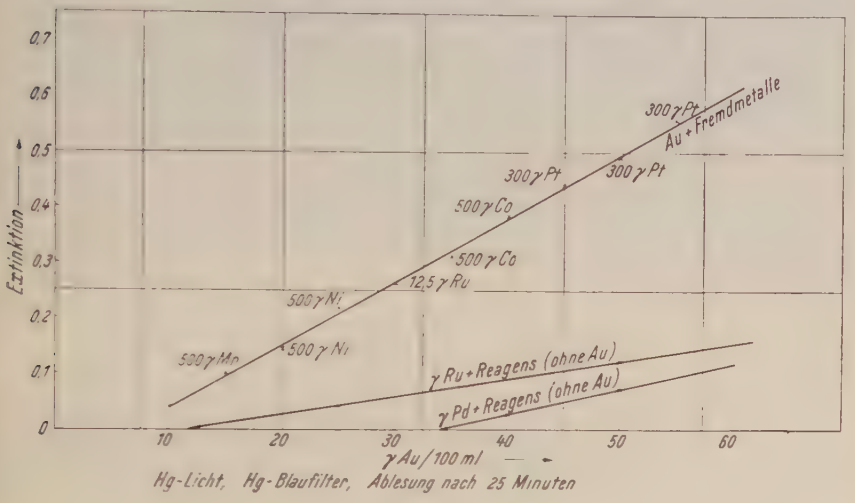


Abb. 6.

Die Tabelle 11 enthält die Goldbestimmungen neben Mangan bzw. Zink (Quecksilberlicht).

Tabelle 11.

Goldmenge in γ/100 ml	Manganmenge in γ/100 ml	Zinkmenge in γ/100 ml	Extinktion E
15	500	—	0,098
15	—	500	0,100
35	500	—	0,320
35	500	—	0,316

9. Neben Calcium, Strontium, Barium, Natrium und Kalium:

Die Blindproben lieferten sämtlich den Wert $E = 0{,}000$. Auch bei Zusatz der Fremdmetalle zu verschiedenen Goldmengen blieben die Extinktionswerte gegenüber der Eichkurve unverändert. Es sei jedoch darauf verzichtet, alle Zahlenwerte für diese Versuche anzuführen.

D. Goldbestimmung in Gegenwart von Edelmetallen.

1. Neben Silber:

Da in salzsaurer Lösung gearbeitet wird, kommt nur der sehr geringe gelöste Anteil des AgCl in Betracht. Bei 20° ist die Löslichkeit des AgCl $1{,}54 \cdot 10^{-4}$ g (in 100 g Lösungsmittel). Diese an AgCl gesättigte Lösung reagiert mit o-Tolidin nicht. Blindprobe: $E = 0{,}000$.

2. Neben Platin:

Zur Herstellung einer Platinchloridlösung wurden 5 mg Reinplatin der Fa. W. C. Heraeus in Hanau/Main eingewogen, mit Königswasser gelöst und einige Male mit konz. HCl bei gelinder Wasserbadwärme abgeraucht. Diese Lösung enthielt 50 γ Pt/ml.

Tabelle 12.

Goldmenge in γ/100 ml	0*	45	50	55
Platinmenge in γ/100 ml	300	300	300	300
Extinktion E (Quecksilberlicht) ..	0,002	0,440	0,492	0,560

0,3 mg Platin/100 ml störten also die Goldbestimmung nicht (vgl. Abb. 6).

3. Neben Palladium:

Zur Herstellung einer Palladiumchloridlösung wurde Reinpalladium der obigen Firma in der Kälte in Königswasser gelöst. Die Lösung war anfänglich blau und wurde später rotbraun. Sie enthielt nach Auffüllen zur Marke 50 γ Pd/ml.

Im Blindversuch ohne Goldzusatz bewirkten 200 γ Pd nach Zufügen von 5 ml Reagens sofort eine gelbe Trübung, die langsam stärker wurde. Beim Stehen setzte sich ein kanariengelber Niederschlag ab, während die überstehende Flüssigkeit noch gelb gefärbt blieb. Es ließ sich nachweisen, daß sich die Extinktion des Goldes zu der des Palladiums ungefähr wie 5 : 1 verhält. Zusätze von weniger als 35 γ Pd auf 100 ml änderten die Extinktion des Goldes praktisch nicht.

Tabelle 13.

Quecksilberlampe; Quecksilber-Blaufilter; 5 ml Reagens; Ablesungen 25 Minuten nach Reagenszusatz; 100-ml-Küvette (vgl. Abb. 6).

Palladiummenge in γ/100 ml	40	50	200
Extinktion E	0,027	0,071	0,490

Bei Anwesenheit größerer Palladiummengen muß also dieses Metall abgetrennt werden[23]. Es ist zwar möglich, Palladium mit Pyridin komplex

* Blindprobe!

zu binden, so daß es nicht mehr mit o-Tolidin reagiert, doch entsteht bei Einwirkung von Pyridin auf Gold in Gegenwart von o-Tolidin eine nicht beständige Blaufärbung, die sich nicht zur kolorimetrischen Bestimmung des Goldes eignet.

4. Neben Osmium und Ruthenium:

Von beiden Metallen (gleichfalls von der Fa. W. C. Heraeus stammend) wurden je 2,5 mg gesondert in einem Silbertiegel, der innen mit einem dünnen Schutzüberzug aus geschmolzenem Natriumhydroxyd versehen worden war, durch eine Natriumperoxydschmelze in lösliche Form gebracht. In warmem Wasser gingen Natriumosmiat bzw. Natriumrutheniat in Lösung. Diese wurde mit HCl angesäuert und auf je 100 ml aufgefüllt, wobei 1 ml 25 γ Metall enthielt.

Tabelle 14.

Hg-Licht; Hg-Blaufilter; 5 ml Reagens; 100-ml-Küvette (vgl. Abb. 6).

Goldmenge in γ/100 ml ..	—	—	—	—	30	40
Rutheniummenge in γ/100 ml	10	12,5	25	50	12,5	10
Extinktion E	0,000	0,004	0,041	0,123	0,263	0,380

Die Gelbfärbung war demnach noch bei einer Konzentration von 25 γ Ru/100 ml merklich.

Osmium erzeugte mit dem Reagens eine gelbgrüne Färbung, die beim Stehen in Grün überging.

Blindprobe: 50 γ Os + 5 ml Reagens zeigten eine Extinktion E = 0,008. Die Färbung war also nicht so stark wie bei Ruthenium.

5. Neben Rhodium und Iridium:

Beide Edelmetalle erzeugen mit dem Reagens keine merkliche Farbreaktion. Von beiden Metallen wurden je 2,5 mg in einem schwer schmelzbaren Reagensrohr innigst mit Natriumchlorid gemischt und im Chlorstrom 10 Minuten lang auf dunkle Rotglut erhitzt. Die entstandene glasige, gefärbte Masse enthielt das Edelmetall als Chlorid. Sie wurde in heißem Wasser gelöst und die Lösung auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösungen enthielten demnach 25 γ Edelmetall in 1 ml.

Blindproben: 50 γ Rh + 5 ml Reagens: E = 0,002 (Quecksilberlicht).
50 γ Ir + 5 ml Reagens; E = 0,007 (Quecksilberlicht).

Vermischt man Lösungen der vier Edelmetalle Ru, Rh, Os und Ir, so bewirkt o-Tolidin eine gelbgrüne Färbung. Beispielsweise verursachten 15 γ Ru + 15 γ Rh + 15 γ Os + 15 γ Ir in 100 ml eine Gesamtextinktion E = 0,065. Diese Färbung addierte sich zu der einer Goldprobe. 30 γ Au+

+ je 15 γ Ru, Rh, Os, Ir erzeugten mit 5 ml o-Tolidin eine Gesamtextinktion $E = 0{,}335$ bzw. 0,332. Der für diese Goldkonzentration aus der Eichkurve interpolierte Wert war $E = 0{,}265$. Daraus ist zu ersehen, daß sich die Extinktionen in der Tat additiv verhalten.

Zusammenfassung.

Es wird eine mikrokolorimetrische Goldbestimmung mit o-Tolidin in salzsaurer Lösung beschrieben. Die Methode erlaubt die Bestimmung von 10 γ Au/100 ml Lösung, bei einer Schichtdicke von 34 mm im lichtelektrischen Kolorimeter nach *B. Lange*. Die optimalen Bedingungen sind Quecksilberlicht, Quecksilber-Blaufilter, $p_H = 1$.

Die folgenden, gleichzeitig anwesenden Metalle haben auf die Gelbfärbung der Gold-Komplexverbindung keinen Einfluß: Pb, Hg(II), Cd, Cu, Sn(IV), Sb(V), Al, Ni, Co, Mn, Zn, Ba, Ca, Sr, Na und K. Fe(III) gibt mit o-Tolidin zwar einen gelben Farbkomplex. Dieser störende Einfluß wurde sorgfältig untersucht. Durch einen Zusatz von Phosphorsäure läßt sich aber Eisen komplex binden, so daß die Goldfärbung nicht mehr gestört wird. Die Goldbestimmung wird durch Palladiumkonzentrationen von über 35 γ Pd/100 ml gestört. Bei dieser und noch größeren Konzentrationen muß das Gold von dem Palladium abgetrennt werden. In Gegenwart von Silber und Platin läßt sich die Goldbestimmung ohne weiteres ausführen, während Rhodium und Iridium bei einer Konzentration von je 25 γ/100 ml noch keine merkliche Färbung mit o-Tolidin zeigen. Osmium dagegen gibt bei über 30 γ/100 ml eine gelbgrüne und Ruthenium bei über 10 γ/100 ml eine gelbe Färbung. Die vier letzteren Edelmetalle Rh, Ir, Os und Ru kommen in natürlichen Proben zusammen meist in einer Menge vor, die um eine Zehnerpotenz kleiner ist als die des Goldes, weshalb dieser Einfluß bei der Goldbestimmung kaum ins Gewicht fällt.

Wird das in einem Erz vorhandene Gold auf dokimastischem oder anderem Wege angereichert, so kann bei einer Einwaage von 20 g ein Goldgehalt von 0,00005% genau bestimmt werden.

Summary.

A micro-colorimetric method of determining gold in hydrochloric acid solution by means of o-tolidine is described. The method permits the determination of 10 γ Au/100 ml in a layer thickness of 34 mm in the photo-electric colorimeter according to *B. Lange*. The optimum conditions are mercury light, mercury blue filter, $p_H = 1$.

It has been found that the following metals, if present along with the gold, have no effect on the yellow gold complex compound: Pb, Hg(II), Cd, Cu, Sn(IV), Sb, Al, Ni, Co, Mn, Zn, Ba, Ca, Sr, Na, K. Ferric iron likewise produces a yellow color complex with o-tolidine. This interference by Fe(III) was carefully studied. The iron may be complexed by adding phosphoric acid,

without disturbing the gold color. Palladium concentration above 35 γ Pd per 100 ml interfere with the gold determination. At this and higher concentrations, the gold must be separated from the palladium. Gold may be determined directly in the presence of silver and platinum, while rhodium and iridium, each at a concentration of 25 γ/100 ml, still give no observable color with o-tolidine. On the other hand, osmium produces a yellowgreen above 30 γ/100 ml and ruthenium a yellow above 10 γ/100 ml. Natural samples usually contain these four noble metals, Rh, Ir, Os, Ru, in a total amount which is less than $^1/_{10}$ of that of the gold; consequently this interference is hardly significant in the gold determination.

If the gold in an ore is enriched by fire assay or some other means, a gold content of 0,00005% can be accurately measured, if a sample of 20 g is taken.

Résumé.

On décrit un dosage microcolorimétrique de l'or en solution chlorhydrique avec l'o-tolidine. La méthode permet le dosage de 10 γ d'or/100 ml pour une épaisseur de 34 mm, dans le colorimètre photo-électrique de *Lange*. Les conditions optimum sont: lumière du mercure, filtre bleu, $p_H = 1$. On a observé que les éléments suivants présents simultanément ne produisaient aucune influence sur la couleur jaune du complexe d'or: Pb, Hg(II), Cd, Cu, Sn(IV), Sb(V), Al, Ni, Co, Mn, Zn, Ba, Ca, Sr, Na, K. Le fer-III donne avec l'o-tolidine un complexe coloré de même en jaune. Cette interférence du fer a été soigneusement étudiée. Par addition d'acide phosphorique, le fer se laisse complexer sans que la teinte jaune ne soit altérée. Le dosage de l'or est troublé par des concentrations en palladium dépassant 35 γ Pd/100 ml. Pour cette concentration et les valeurs plus grandes, l'or doit être séparé du palladium. En présence d'argent et de platine, le dosage d'or se laisse faire sans difficulté tandis que le rhodium et l'iridium, pour une concentration de 25 γ/100 ml ne montrent encore aucune coloration perceptible. L'osmium cependant donne pour 30 γ/100 ml une teinte vert-jaune et le ruthénium, au-dessus de 10 γ/100ml, une teinte jaune. Les 4 derniers métaux rares Rh, Ir, Os et Ru existent dans les échantillons naturels, le plus souvent, en teneur qui est une puissance de 10 plus faible que celle de l'or; c'est pourquoi cette influence se fait à peine sentir sur le dosage de l'or. Si l'on enrichit l'or contenu dans un minerai, par voie analytique ou autre, on peut, pour une prise d'essai de 20 g, doser l'or contenu jusqu'à 0,00005% avec précision.

Diskussion.

H. *O. Hackl* (Wien, Österreich): Ich möchte darauf hinweisen, daß sich schon seit Jahren in der Literatur die fehlerhafte Angabe „Toluidin" statt Tolidin eingeschlichen hat und scheinbar weit verbreitet ist.

Literatur.

[1] Vgl. u. a.: *V. Goldschmidt*, Z. analyt. Chem. **16**, 439, 449 (1877); **17**, 142 (1878); Z. Kristallogr. **9**, 571 (1878). — *F. Haber* und *J. Jaenicke*, Z. anorg. Chem. **147**, 156 (1925). — *F. Haber*, Naturwiss. **14**, 405 (1926). — *F. Haber, J. Jaenicke* und *F. Matthias*, Z. anorg. Chem. **153**, 153 (1926). — *E. Thiede, A. Schleede* und *F. Goldschmidt*, Ber. dtsch. chem. Ges. **59**, 1629 (1926). — *G. Lunde*, Mikrochem. **5**, 102 (1927); Metall-Wirtschaft **7**, 415 (1928). — *J. Donau*, Mikrochem. **13**, 165 (1933); **17**, 174 (1935); **18**, 11 (1935);

Z. analyt. Chem. **104**, 257 (1936). — *F. Hecht* und *J. Donau*, Anorganische Mikrogewichtsanalyse, Springer-Verlag Wien. 1940. S. 303.

[2] *S. O. Thompson, F. E. Beamish* und *M. Scott*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **9**, 420 (1937). — *F. E. Beamish, J. J. Russel* und *J. Seath*, ibidem, 174, 373 (1937).

[3] *J. Babička*, Mikrochem. **31**, 201 (1944).

[4] *R. Strebinger* und *W. Reif*, Mitt. Numismat. Ges. Wien **16**, 209 (1932).

[5] *W. Geilmann* und *O. Meyer-Hoissen*, Glastechn. Ber. **13**, 86 (1935).

[6] *L. Ebert* und *A. Dirscherl*, Mikrochem. **35**, 346 (1950).

[7] *F. Hecht* und *G. Lamac-Brunner*, Mikrochem. **35**, 390 (1950).

[8] Tabellen der Reagenzien für anorganische Analyse, Akadem. Verlagsges. Leipzig, 1938. Siehe auch die späteren Berichte der Internationalen Kommission für neue analytische Reaktionen und Reagenzien.

[9] *A. Trillat*, C. r. acad. sci., Paris, **136**, 1205 (1903).

[10] *R. J. Carney*, J. Amer. Chem. Soc. **34**, 32 (1912).

[11] *J. A. Siemssen*, Chem.-Ztg. **36**, 934 (1912).

[12] *J. E. Saul*, Analyst **38**, 54 (1913).

[13] *F. Feigl*, Z. analyt. Chem. **74**, 380 (1928).

[14] *H. Holzer*, Mikrochem. **8**, 271 (1930). — *F. Feigl*, Mikrochem. **9**, 165 (1931).

[15] *G. Malatesta* und *E. di Nola*, Boll. chim. farm. **52**, 461 (1913); durch Z. analyt. Chem. **61**, 184 (1922).

[16] *H. Holzer* und *W. Reif*, Z. analyt. Chem. **92**, 12 (1933).

[17] *R. Piria*, Ann. Chem. **78**, 64 (1851).

[18] *H. Schiff*, Ann. Chem. **101**, 92 (1857).

[19] *W. B. Pollard*, Chem. News **118**, 162 (1919); Analyst **44**, 94 (1919).

[20] *W. D. Block* und *O. H. Buchanan*, J. Biol. Chem. **136**, 379 (1940).

[21] *G. Milazzo*, Analyt. Chim. Acta **3**, 126 (1949).

[22] *B. Lange*, Kolorimetrische Analyse, Verlag Chemie Berlin. 1941.

[23] Vgl. *W. D. Treadwell*, Helv. Chim. Acta **4**, 364 (1921).

Aus dem Mineralogischen Institut der Universität Wien.

Spurensuche seltener Elemente mit Hilfe der Lumineszenzanalyse.

Von

H. Haberlandt.

(Eingelangt am 18. Juli 1950.)

In einem unvergeßlichen Vortrag hat im Jahre 1931 *Emich* die Wichtigkeit der Spurensuche hervorgehoben. Seit damals hat die Bedeutung der Spurenelemente in ungeahnter Weise zugenommen. Zu ihrer Erforschung wurden neben den mikrochemischen auch physikalische Methoden entwickelt. Es ist das unbestrittene Verdienst von *Max Haitinger*, nach den seinerzeit bahnbrechenden Arbeiten eines *Crookes* und *Lecoq de Boisbaudran* die Fluoreszenzanalyse in größtem Ausmaß entwickelt und für die mikrochemische Forschung eingesetzt zu haben. *Haitinger* verdanke auch ich die ersten Anregungen. Gemeinsam mit *K. Przibram* und *B. Karlik*[1] konnte ich im Wiener Radiuminstitut eine Reihe von Arbeiten über das Verhalten seltener Erden im Calciumfluorid im filtrierten ultravioletten Licht durchführen. Ich darf sagen, daß diese Untersuchungen, bei denen uns Herr Professor *Jantsch* (Graz) durch die Herstellung reiner Europiumdichloridpräparate weitgehend unterstützte, ein gewisses Mißtrauen zerstreuen halfen, das seinerzeit von vielen Forschern der Lumineszenzanalyse entgegengebracht wurde.

Die Vielfalt der Erscheinungen, die Beeinflußbarkeit der Lumineszenzfarbe und -helligkeit durch störende und sensibilisierende Elemente ließen ein solches Mißtrauen zunächst als gerechtfertigt erscheinen. Wir wissen aber heute, daß durch eine reinliche und systematische Behandlung der Erscheinungen eine klare und eindeutige Erforschung des vorliegenden Gebietes möglich ist. Schließlich gibt es auch bei jeder chemisch-analytischen Reaktion Störungsmöglichkeiten durch andere Elemente, die gerade in der Mikrochemie besonders berücksichtigt werden müssen. Wenn ich hier besonders über die Anwendung der Lumineszenzanalyse zur Spurensuche auf mineralogischem Gebiet

berichte, so geschieht dies auf Grund nicht nur eigener Arbeiten, sondern auch infolge der Zusammenarbeit mit Physikern und Chemikern des Radium-Institutes der Österreichischen Akademie der Wissenschaften in Wien, wobei vielfach bereits veröffentlichtes Material[2] im Hinblick auf dessen mikrochemische Bedeutung vorgebracht werden soll.

Die natürlichen Mineralien und Kristalle haben, wie wir seit den grundlegenden Arbeiten von *V. M. Goldschmidt* wissen, eine kristallchemisch bedingte Spurenelementparagenese; ich möchte den Ausdruck „Mikroparagenese" hierfür gebrauchen. Es ist wesentlich, die ganze Spurenelementenverteilung kennenzulernen, wenn ein oder das andere dieser Elemente lumineszenzanalytisch festgestellt werden soll.

Der gegebene Weg, um eine Lumineszenzanalyse durchzuführen, ist folgender:

1. Eine möglichst vollständige spektrographische und mikrochemische Erfassung aller in Frage kommenden seltenen Elemente;

2. eine synthetische Herstellung des betreffenden Minerals unter systematischer Hinzufügung derjenigen Spurenelemente, die als Aktivatoren vermutet werden;

3. kritische Erprobung der störenden oder sensibilisierenden Eigenschaften der anderen Spurenelemente (störend: Fe, Cu, teilweise Mn; sensibilisierend: Pb, Bi), die in dem betreffenden Mineralvorkommen festgestellt wurden.

Dazu ist noch zu sagen, daß ein und dasselbe Mineral auf verschiedenen Bildungen (Lagerstätten) eine verschiedene „Mikroparagenese" von Spurenelementen haben kann, die unter Umständen für eine bestimmte Bildungsweise charakteristisch ist.

Die Auswertung der Fluoreszenzspektren erfolgt zum Teil nach ganz anderen Gesichtspunkten als die der gewöhnlichen Spektren. Die Methode der letzten Linien, wie sie von *de Gramont* entwickelt wurde, läßt sich nicht ohne weiteres auf das Gebiet der Fluoreszenzspektrographie anwenden. Nur bestimmte Elemente, wie die dreiwertigen seltenen Erden Dysprosium, Samarium, Terbium, Erbium, das dreiwertige Chrom, teilweise das zweiwertige Mangan und die Uranylverbindungen[2a], liefern scharfe linienartige Spektren, während die zweiwertigen seltenen Erden (Europium, Ytterbium, Samarium, Thulium), das dreiwertige Cer, das zweiwertige Mangan und die Uranate im allgemeinen breite, sich über einen größeren Teil des Spektrums erstreckende Banden ergeben. Außerdem ist die Bandenlage im Fluoreszenzspektrum von der chemischen Zusammensetzung und letzten Endes von der Kristallstruktur der Grundsubstanz abhängig.

Unter Umständen kann sogar die Valenz eines Elementes bestimmt werden, so kann man z. B. auf Grund des Fluoreszenzspektrums zwei-

und dreiwertiges Europium recht schön unterscheiden. Wenn auf Grund der photometrierten Fluoreszenzbanden eine quantitative Auswertung vorgenommen werden soll, so muß vor allem folgendes berücksichtigt werden: Die Intensität der Bandenhelligkeit ist ein Maßstab für die Konzentration des betreffenden aktivierenden Elementes nur unter der Voraussetzung der Störungsfreiheit. Die Intensitätskurven besitzen ein zumeist breites Maximum entsprechend einem optimalen Gehalt des Aktivators. Bei einer bestimmten Helligkeit gibt es nun — vom Optimum selbst abgesehen — je zwei Punkte der Intensitätskurve, die verschiedenen Gehalten entsprechen: einem höheren als dem Optimum und einem geringeren. Die Grenzkonzentration bzw. die Erfassungsgrenze ist bei der Lumineszenzanalyse zumeist sehr klein; es lassen sich in vielen Fällen noch weit geringere Spuren erfassen als bei der Spektralanalyse. Hierüber gibt Tabelle 1 Aufschluß, deren Angaben zum Teil den Arbeiten *Przibrams*[3] und seiner Mitarbeiter entnommen sind, zum Teil auf eigenen Beobachtungen beruhen, und auch die Ergebnisse von *W. L. Brown*[4] betreffend das Leuchtoptimum des Mangangehalts in Kalkspaten, sowie die Ergebnisse der synthetischen Zinksulfidforschung berücksichtigen.

Tabelle 1.

Element	Grundmaterial	Fluoreszenzfarbe	Optimum der Lumineszenz*	Grenzkonzentration*
UO_2^{2+}	NaF	gelbgrün	10^{-4}	unter 10^{-10}
Sm^{2+}	CaF_2	rot	?	„ 10^{-8}
Eu^{2+}	NaCl	blau	?	„ 10^{-9}
Eu^{2+}	CaF_2	blau	10^{-3} bis 10^{-4}	„ 10^{-6}
Yb^{2+}	CaF_2	gelbgrün**	10^{-3} bis 10^{-4}	„ 10^{-6}
Tm^{2+}	$CaSO_4$	rot**	10^{-3}	„ 10^{-8}
Sm^{2+}	$CaSO_4$	rot	10^{-3}	„ 10^{-7}
Eu^{2+}	Plagioklas	blau	$4 . 10^{-4}$	„ 10^{-6}
Ce^{3+}	„	blau	$3 . 10^{-3}$	„ 10^{-5}
Mn^{2+}	$CaCO_3$ (Kalkspat)	rot	$3 . 10^{-2}$	10^{-3} bis 10^{-4}
Cr^{3+}	Al_2O_3 (Rubin)	rot	10^{-3}	10^{-4} bis 10^{-5}
Ag	ZnS	blau	10^{-4}	unter 10^{-7}
Cu	ZnS	grün***	10^{-4}	„ 10^{-8}
Mn^{2+}	ZnS	gelb	über 10^{-2}	„ 10^{-5}

* Gehalt in g pro g Substanz.
** Bei Tieftemperatur.
*** Phosphoreszenz.

Abgesehen von einem direkten Nachweis in einer bestimmten Grundsubstanz ist es ferner möglich, die betreffende Verbindung samt Aktivator in eine leuchtfähige umzuwandeln, wobei störende Elemente entfernt werden können und das Leuchtoptimum dann günstiger liegt.

Dieser Weg wurde von *Merkader*[5] im Wiener Radium-Institut eingeschlagen; es wurden samariumhaltige Fluorite, welche die bekannte rote Bande des zweiwertigen Samariums zeigen, in Calciumsulfat verwandelt* und dieses mit Radium entsprechend bestrahlt. Auf Grund der nun neuerlich auftretenden Bande im Rot, die nach Untersuchungen von *Przibram*[6] ebenfalls durch Samarium bewirkt wird, wurde durch Vergleich mit Eichmischungen das Samarium im ursprünglichen Fluorit quantitativ bestimmt (Größenordnung: 1 bis $8 \cdot 10^{-5}$ g Sm/g Fluorit).

Eine andere Methode haben *Haberlandt* und *Koehler*[7] zwecks lumineszenzanalytischer Bestimmung des Europiumgehaltes von Feldspaten gewählt. Es wurden natürlich vorkommende Kali-Feldspate und Kalk-Natron-Feldspate bei reduzierender Atmosphäre geschmolzen und die erzielte blaue Fluoreszenz mit der von synthetischen Feldspatschmelzen von bestimmtem Europiumzusatz verglichen. Es gelang auf diese Weise, den Europiumgehalt der Feldspate größenordnungsmäßig zu etwa 10^{-6} bis 10^{-5} g Eu pro g Feldspat zu erfassen. Diese Werte stimmen recht gut mit spektrographischen Bestimmungen überein, die von *A. Kvalheim* in Oslo ausgeführt wurden. Durch Aufschluß anderer Mineralien in den Feldspatschmelzen konnten wir fluoreszenzanalytisch auch einen Befund von *J. H. L. Marsh*[8] bestätigen, der eine merkwürdige Europiumanreicherung in hydrothermalen Uranpecherzen (z. B. von Joachimstal) festgestellt hatte.

Der Vollständigkeit halber soll erwähnt werden, daß auch das dreiwertige Cer eine blaue Fluoreszenz von etwas anderer Bandenlage in diesen Schmelzen ergibt, doch liegt die Empfindlichkeit etwa um eine Zehnerpotenz niedriger als beim Europium. Auch im natürlichen Calciumphosphat (Apatit) ergibt sich bei höherem Cergehalt eine schöne blaue Cerfluoreszenz.

Sogenannte Yttrofluorite mit einem größeren Gehalt an Ytererden (über 17%) wurden seinerzeit von *Th. Vogt* entdeckt und analysiert. Auf Grund der Ähnlichkeit des Fluoreszenzspektrums mit zahlreichen deutlichen linienartigen Banden konnte ich bei einem südwestafrikanischen Fluorit von der Spitzkopje den Nachweis führen, daß auch hierbei ein Yttrofluorit vorliegt[9]. Bestätigt wurde dieser Befund durch eine spektrographische Analyse, die auch eine bemerkenswerte Ytterbiumanreicherung mit 0,1 bis 1% Yb ergab. Auch bei anderen pegmatitischen Fluoriten zeigt sich ein Gehalt an zweiwertigem Ytterbium durch eine breite helle Bande im Gelbgrün an, die bei der Temperatur der flüssigen Luft auftritt.

* Das in der Natur vorkommende Calciumsulfat (Anhydrit) kann Sm^{2+} enthalten und leuchtet dann im UV-Licht schön rot.

Anderseits gibt es eine Reihe hydrothermaler Fluorite mit einer hellblauen Bande bei gewöhnlicher Temperatur, die dem zweiwertigen Europium zukommt. Diese Differentiation der seltenen Erden in Fluoritkristallen ist eine sehr bemerkenswerte Erscheinung, da nach spektrographischen Befunden europiumreiche Fluorite mit $4 \cdot 10^{-4}$ g Eu fast kein Ytterbium, ytterbiumreiche Fluorite mit 10^{-4} g Yb fast kein Europium enthalten. Außerdem zeigt die Fluoreszenz sehr schön die sich oft periodisch wiederholende und in bestimmten Zonen ein und desselben Kristalles eingelagerte Beimengung der Aktivatoren auf. So leuchtet der schon erwähnte Yttrofluorit von der Spitzkopje in äußeren Zonen blau — bei Zurücktreten der Yttererden in diesen Zonen —, während der Kern aus yttererdenreichem Yttrofluorit besteht.

Auch bei der roten, durch zweiwertiges Samarium bedingten Fluoreszenz mancher natürlicher radiumbestrahlter Fluorite zeigt sich eine zonare Verteilung mit einer Anreicherung des Samariums in den Außenzonen und hier wiederum in den Diagonalzonen nach den Ecken der Kristallwürfel zu.

Beim Kalkspat[10] ist eine außerordentliche Mannigfaltigkeit im Lumineszenzverhalten zu beobachten. Folgende aktivierende Elemente kommen in Frage: 1. Mangan in zweiwertiger Form. Wie amerikanische Forschungen[11] ergeben haben, ist die ziegelrote, mit einem kurzen Nachleuchten verbundene Manganfluoreszenz im Calciumcarbonat* durch kleine Bleispuren sensibilisiert. 2. Seltene Erden. Diese kommen ähnlich wie beim Fluorit sowohl in drei- als auch in zweiwertiger Form vor und zeigen die entsprechenden linienartigen oder bandenartigen Fluoreszenzspektren. Sie sind ebenfalls meist zonar verteilt. Die Gehalte liegen in den hundertstel Prozenten. Recht interessant gestaltete sich die Untersuchung eines teils rosa, teils grün gefärbten Kalkspates von Texas, den ich Herrn Dr. *Lee* verdanke. Die schöne rosa Fluoreszenz des rosa gefärbten Teiles weicht einer hellblauen Fluoreszenz beim Erhitzen. Diese blaue Fluoreszenz findet sich bereits im Naturzustand des grünen Teiles und dürfte durch zweiwertiges Europium bewirkt sein. Dagegen scheint die rote Fluoreszenz ähnlich wie beim Fluorit durch zweiwertiges Samarium aktiviert zu sein, da sie nach dem Erhitzen durch Radiumbestrahlung regeneriert werden kann.

Außer den anorganischen Spurenelementen gibt es eine Reihe organischer Komplexverbindungen in Kalkspaten. *Blumer* konnte außerordentlich interessante organische Farbkörper in Kalken bestimmen. Schon vor längerer Zeit konnte ich[12] in Zusammenarbeit mit *Hans Fischer*

---

* Das Optimum des Leuchtens liegt bei relativ hohen Mangangehalten (3,5% $MnCO_3$).

(München) eine Galliumporphyrinkomplexverbindung in einem natürlichen kristallisierten Kalkspat aus Deutsch-Altenburg nachweisen. Dieselbe Verbindung wurde von *H. Treibs* synthetisch hergestellt und zeigt die gleichen spektralen Eigenschaften wie die wunderschön karminrot leuchtende natürliche Verbindung.

In einer Arbeit, die im mineralogischen Institut in Wien durchgeführt wurde, untersuchten wir eine hellblaue Fluoreszenz eines violett gefärbten Magnesits aus Katanga, der nach dem spektrographischen Befund Vanadium enthält. *E. Schroll* und ich analysierten das Mineral und fanden etwa 0,13% Vanadium neben 0,05% Mangan und einen etwas wechselnden Eisengehalt (bei den leuchtenden Stellen unter 0,1%). Wahrscheinlich ist hier das Vanadium als Aktivator zu betrachten. Wir haben Anhaltspunkte dafür, daß es in einer niedrigen Wertigkeit vorliegt.

In letzter Zeit haben *Schroll* und ich[13] uns auch eingehend mit der Lumineszenz der Zinkblende beschäftigt. Obwohl wir bei den synthetischen Zinksulfidphosphoren über die aktivierenden Elemente bis in das kleinste Detail orientiert sind, liegt über die Lumineszenz der natürlichen Zinkblende bisher nur eine Arbeit von *N. Riehl*[14] vor, welche die schön orangegelbe Lumineszenz der Zinkblende von Tsumeb untersucht. Nach Spektralanalysen von *H. Moritz* hat diese Zinkblende einen Mangangehalt von etwa einigen Hundertstel- bis zu einem Zehntelprozent, der das schöne Leuchten bedingt. Voraussetzung hierfür ist wieder die relative Eisenarmut. Wir haben nun in Österreich eine sehr eisenarme Zinkblende in Bleiberg-Kreuth (Kärnten), die zur Lumineszenz förmlich prädestiniert ist. Ihr Mangangehalt beträgt bei den hellgelb leuchtenden Formen nach einer spektrographischen Schätzung von *Schroll* etwa 0,01% und dürfte die schöne hellgelbe Lumineszenz bedingen. Außerdem gibt es Stücke von Bleiberger Zinkblende, die eine weiße bis blaue Lumineszenz neben der gelben und gelbroten in bandartiger Anordnung erkennen lassen. Besonders mit dem Fluoreszenzmikroskop der Firma C. Reichert (Wien) lassen sich im Auflicht wundervolle Leuchterscheinungen aufzeigen. Man erkennt eine außerordentliche Mannigfaltigkeit von Erscheinungen, auch eine zonare, periodisch sich wiederholende Anordnung mancher Leuchtzonen, orientiert zu bestimmten Kristallflächen.

Die blaue Lumineszenz konnten wir in Analogie zu den Leuchterscheinungen bei den synthetischen Phosphoren auf einen spektrographisch nachgewiesenen kleinen Silbergehalt (10^{-4}%) zurückführen. Eine mehr rötliche Leuchtfarbe ist nach den Ergebnissen russischer Forscher durch einen kleinen Eisengehalt bewirkt.

Die Lumineszenz der Materie zeigt, wie aus den angeführten Beispielen zu entnehmen ist, in schönster Weise, daß bis in den kleinsten

Kristallraum eine gesetzmäßige Differentiation der Spurenelemente vor sich geht: ganz im Gegensatz zu der Anschauung von der Allgegenwart der Elemente im Sinne von *Noddack*, gegen die bereits *V. M. Goldschmidt* Stellung genommen hat. Der Mikroanalytiker wird nicht nur die Lumineszenzanalyse als Nachweismethode, sondern auch ihre Ergebnisse mit Vorteil bei der Auswahl des Analysenmaterials benützen können.

Zusammenfassung.

Die Spurensuche seltener Elemente im filtrierten ultravioletten Licht hat sich erst in den letzten 20 Jahren durch verschiedene systematische Untersuchungen hauptsächlich über seltene Erden, Chrom und Mangan als Aktivatoren in verschiedenen Mineralien auf eine exakte und entwicklungsfähige Grundlage stellen lassen. Voraussetzung für solche Untersuchungen ist vor allem die Herstellung synthetischer Präparate und die vollständige Erfassung der störenden und sensibilisierenden Elemente und der ganzen „Mikroparagenese" der Spurenelemente in den natürlich vorkommenden kristallisierten Mineralien. Die Beurteilung der Fluoreszenzspektren erfordert eine eigene Technik, welche von der sonst in der Spektrographie gebräuchlichen in mancher Beziehung verschieden ist. Die bisherigen Untersuchungen zeigen eine besonders bei Verwendung des Reichertschen Fluoreszenzmikroskopes bis in kleinste Kristallräume beobachtbare Differenzierung der aktivierenden Spurenelemente (seltene Erden in Fluoriten, Silber und Mangan in natürlichen Zinksulfidkristallen).

Der Mikroanalytiker wird daher die Lumineszenzanalyse nicht nur als besonders empfindliche Nachweismethode, für seltene Elemente, sondern auch ihre Ergebnisse mit Vorteil bei der Auswahl des Analysenmaterials benützen können.

Summary.

It is only in the last 20 years that the search for traces of rare elements in filtered ultraviolet light could be put on an exact basis that is capable of development. This is the outgrowth chiefly of systematic studies of rare earths, chromium and manganese as activators in various minerals. A presupposition for such investigations is above all the production of synthetic preparations, the most complete understanding of the disturbing and sensitizing elements, and the entire "micro-paragenesis" of the trace elements in the naturally occuring crystalline minerals. The interpretation of the fluorescence spectra requires a special technique, which differs in some respects from that usually employed in spectrography. The studies made up to now, especially these using the Reichert fluorescence microscope, reveal, even in the smallest crystal spaces, an obsecrable differentiation of the activating trace elements (rare earths in fluorites, silver and manganese in naturel zinc sulphide crystals).

Therefore, the microanalyst can use luminescence analysis not only as an especially sensitive method of detecting rare elements, but he can also advantageously apply its results to the choice of materials for analysis.

Résumé.

La recherche de traces d'éléments rares en lumière ultraviolette filtrée ne s'est installée que depuis les 20 dernières années par des travaux systématiques, variés, principalement comme base exacte et susceptible de développement, pour les terres rares, le chrome et le manganèse, comme activateurs dans divers minéraux. Pour de telles recherches, on suppose avant tout l'obtention de préparations synthétiques, l'expression complète des éléments gênants et sensibilisants et toute la «microparagénèse» des traces dans les minéraux naturellement cristallisés. L'obtention des spectres de fluorescence nécessite une technique appropriée qui est déjà répandue à divers points de vue en spectrographie. Les recherches déjà faites montrent, particulièrement par l'emploi du microscope à fluorescence de Reichert, une différenciation jusque dans les plus petites cellules cristallines, des traces actives (terres rares dans les fluorines, argent et manganèse dans les cristaux naturels de blende).

Les microanalystes peuvent utiliser, par conséquent, l'analyse par luminescence, non seulement comme méthode de recherche particulièrement sensible pour les éléments rares, mais aussi, avec avantage, pour le choix des matériaux d'analyse.

Literatur.

[1] *H. Haberlandt, B. Karlik* und *K. Przibram*, Sitz. Ber. Akad. Wiss. Wien IIa **142**, 235 (1933); **143**, 151 (1934); **144**, 77, 135, (1935).

[2] *H. Haberlandt* und *A. Koehler*, 1. Sonderband d. Zeitschr. „Mikroskopie" 102 (1949). Ferner: *H. Haberlandt*, Sitz. Ber. Akad. Wiss. Wien I, **158**, 609, (1949).

[2a] *H. Haberlandt, F. Hernegger, F. Scheminzky*; Spectrochim. Act., **4**, 21, (1950).

[3] *K. Przibram*, Mikrochim. Acta **3**, 68 (1938).

[4] *W. L. Brown*, Univ. Toronto geol. ser. Nr. 36, 45 (1934).

[5] *S. Merkader*, Sitz. Ber. Akad. Wiss. Wien IIa, **149**, 349 (1940).

[6] *K. Przibram* und *B. Karlik*, Sitz. Ber. Akad. Wiss. Wien IIa **146**, 209 (1937).

[7] *H. Haberlandt* und *A. Koehler*, Chem. d. Erde **13**, 363 (1940).

[8] *J. K. Marsh*, Phil. Mag. **7**, 1005 (1929).

[9] *H. Haberlandt*, Sitz. Ber. Akad. Wiss. Wien IIa **147**, 137 (1938).

[10] *H. Haberlandt*, Sitz. Ber. Akad. Wiss. Wien IIa **158**, 609 (1950).

[11] *J. H. Schulman* und Mitarbeiter, J. Appl. Phys. **18**, 732 (1947).

[12] *H. Haberlandt*, Wr. Chem.-Ztg. **47**, 1 (1944).

[13] *H. Haberlandt* und *E. Schroll*, Experientia **6**, 91 (1950).

[14] *N. Riehl*, Fundamenta Radiologica **4**, 3 (1933).

Aus dem II. Chemischen Universitätslaboratorium in Wien.

Die quantitative Mineral-Mikroanalyse und ihre Bedeutung für Mineralogie und Geologie.

Von

Friedrich Hecht.

(Eingelangt am 16. Dezember 1950.)

Während die anorganische quantitative Mikroanalyse sich in ihren Anfängen auf die Bestimmung einzelner Bestandteile und Elemente in einfachen anorganischen Substanzen, organischen Verbindungen oder in Stoffen hauptsächlich biologischer, mineralogischer, metallurgischer oder sonstwie technologischer Herkunft beschränkt hatte, konnte das Bedürfnis nach der Ausführbarkeit von Trennungen befriedigt werden, als die mikroanalytische Arbeitstechnik durch die Filterstäbchenmethodik von *Emich* bereichert worden war. Sehr rasch erwuchs aus der Dringlichkeit der Problemstellungen eine Mikro-Mineral- und Legierungsanalyse.

Die Pionierarbeit auf dem Gebiete der Mineral-Mikroanalyse wurde von *A. A. Benedetti-Pichler* und seinen Mitarbeitern[1] geleistet, die sich die Analyse des Minerals Kolbeckit, eines Berylliumsilicophosphates, zum Ziel gesetzt hatten. Die erste dieser Arbeiten erschien im Jahre 1930, also vor nunmehr 20 Jahren. Bevor die Analyse des eigentlichen Minerals begonnen wurde, überprüften *Benedetti-Pichler* und seine Mitarbeiter *F. Schneider* sowie *Hilde Thurnwald* die einzelnen Bestimmungs- und Trennungsmethoden mit bekannten Mengen reiner Substanzen, Testlösungen und Testmischungen und wiesen damit für viele der Nachfolger den Weg, der zu einer exakten Mikromethodik führt. Es kann nicht genug betont werden, daß die Mikroanalyse kompliziert zusammengesetzter Substanzen nicht nach einem beliebigen Lehrbuch der analytischen Chemie ausgeführt werden kann; daß es nicht möglich ist, eine auf dem Papier ausgedachte Methode nach einem makroanalytischen Vorbild ohne Erprobung anzuwenden. Man muß vielmehr mit Mißtrauen jeder Mikroanalyse solcher zusammengesetzter Substanzen begegnen, die nicht an Testgemischen erprobt worden ist.

Das Mineral Kolbeckit enthielt die Bestandteile SiO_2, P_2O_5, Al_2O_3, Fe_2O_3, CaO, MgO, BeO und H_2O. Die Analysen wurden mit Einwaagen von 3 bzw. 3,5 mg Mineralpulver ausgeführt.

In einer Reihe von Arbeiten beschrieben 1932 und in den folgenden Jahren *F. Hecht*, *W. Reich-Rohrwig*, *Edith Kroupa* und einige andere Mitarbeiter[2] die quantitative Mikroanalyse von Uran- und Thoriummineralien. Die Analysengänge bedienten sich zum größeren Teil mancher Trennungsverfahren, die ihr Vorbild in makroanalytischen Methoden hatten, doch wurden auch Trennungen und andere Bestimmungen mit organischen Fällungsmitteln ausgeführt, vor allem mit 8-Oxychinolin bzw. Pikrolonsäure (für Uran, Thorium usw.). Bei der Arbeitstechnik wurden Platin- und Porzellantiegel, Mikrobecher aus Jenaer Geräteglas, Jenaer Mikrofilterbecher, Platin- und Porzellanfilterstäbchen verwendet. Die Zahl der so ausgeführten Vollanalysen überschritt 50. Es wurden dabei folgende Bestandteile bestimmt: SiO_2, Fe, Al, Ca, Mg, Th, U, seltene Erden, Pb, CO_3. Besonders für die Kohlensäure hat *Reich-Rohrwig*[2] eine schöne Bestimmungsmethode angegeben, die sich einer Mikroapparatur nach dem Vorbild der Makroapparatur von *Fresenius-Classen* bedient und äußerst exakte Resultate liefert.

Eine Pechblende vom Großen Bärensee in Kanada wurde von *F. Hecht* und *Edith Kroupa*[3] mikroanalysiert, wobei 18 Bestandteile bestimmt wurden. In einem Uraninit von Wilberforce, Kanada, wurden 13 Bestandteile ermittelt.

Kroupa und *Hecht*[4] dehnten diese Verfahren auch auf die Vollanalyse von Monaziten aus, die ein Phosphat hauptsächlich der Ceriterden darstellen. Alle diese Methoden wurden mit Testgemischen, die künstlichen Uran- und Thoriummineralien entsprachen, genau überprüft. Aus einer Reihe von Testlösungen bzw. Testsubstanzen wurden die monazitähnlichen Gemische zusammengesetzt, und zwar aus Nitrat- oder Chloridlösungen von Al, Fe, Mn, Ca, Mg, Th, U, Pb, seltenen Erden, aus Ammoniumphosphat und reinstem, gepulvertem Bergkristall. Das Blei mußte wegen der Unmöglichkeit, wenige Hundertstelprozent dieses Elementes exakt von Molybdän zu trennen, in einer gesonderten Einwaage bestimmt werden, wozu ein Aufschluß mit reinstem Natriumhydroxyd diente. Die bei der Analyse des Testgemisches erhaltene Summe betrug 100,2% (bei elf Bestandteilen) bzw. 100,02%.

Ein anderer Typus von Mineralien, der das Interesse mancher Mikroanalytiker weckte, waren sulfidische Mineralien. Den Beginn machte der ungarische Forscher *A. v. Endrédy*[5] 1932, der die Analyse von Semseyit (Bleisulfoantimonit) im Dekamilligrammaßstab ausführte. Als Aufschlußverfahren wählte er den Aufschluß mit Chlorgas im *Pregl*schen Perlenrohr. In jüngster Zeit arbeitete die schwedische Forscherin *Anna-Greta Hybbinette*, eine Schülerin *Benedetti-Pichlers*, eine quantitative

Mikroanalysenmethode für ein Zinksulfidmineral, den Sphalerit, aus[6]. Der Analysengang wurde hinsichtlich Si, Cu, Zn, Al, Fe, Ca, Mg im Modellversuch mit Testlösungen überprüft. Mit nur 60 mg Mineraleinwaage wurden schließlich alle Bestandteile in Parallelbestimmungen ermittelt. In dem natürlichen Mineral wurden auch noch Bi, Mn, S und Phosphorsäure bestimmt. Ferner wurde für Pb und Cd ein mikropolarographisches Verfahren an Testlösungen ausgearbeitet.

Schon frühzeitig wurde die Silikatanalyse in den Kreis der quantitativen Mikroanalyse aufgenommen. 1932 bereits machte *H. Hueber*[7] im Wiener Mineralogischen Universitätsinstitut den Versuch, den *Hillebrand*schen Makroanalysengang für Silikate auf gesteinsbildende Granaten anzuwenden.

H. K. Alber und *C. Benedicks*[8] sowie *R. Treje* und *H. K. Alber*[9] befaßten sich mit der quantitativen mikrochemischen Analyse von elektrolytisch isolierten Schlackeneinschlüssen in Stahl. Es handelte sich dabei um die Trennung und Bestimmung von Si, Al, Fe, Mn und S. Die Methode wurde an Modellsubstanzen ausgearbeitet. Zur weiteren Prüfung wurden drei Proben des Minerals Knebelit, eines Fe-Mn-Silikates mit einer Zusammensetzung, die mitunter bei Schlackeneinschlüssen gefunden wird, analysiert. Frühere Makroanalysen dieses Minerals stimmten gut mit den nunmehr mikroanalytisch gewonnenen Werten überein. Ähnliche Mikroanalysen wurden an Schlackeneinschlüssen während des Krieges von *Edith Kroupa* ausgeführt, blieben aber unveröffentlicht.

In den Jahren 1933 bis 1935 arbeitete der japanische Forscher *Matsusaburo Shioiri* mit seinen Mitarbeitern *Nagahara* und *Kanematsu*[10] an Testsubstanzgemischen einen Mikrotrennungs- und -bestimmungsgang für Fe, Ti, Al, Mn, Ca, Mg, K, Na und P_2O_5 aus. Durch Einführung maßanalytischer Methoden oder durch Anwendung von Fällungsformen mit günstigem Umrechnungsfaktor wurde getrachtet, die Analysen weitgehend mit Hilfe einer guten normalen Analysenwaage durchzuführen. Nicht weniger als sieben vollständige Beleganalysen mit sehr guter Übereinstimmung sind angeführt. Die Methode wurde hierauf auf Minerale, und zwar Orthoklas, Diopsid und kolloide Anteile der japanischen Säureerde angewendet. Die Kieselsäure wurde dabei in den Analysengang miteinbezogen. Auch das *Donau*sche Platinfilterschälchen wurde dabei benützt. *I. Iwasaki*[11] wendete hierauf *Shioiris* Methoden auf eine Art nicht völlig homogener, durch sehr kleine Einsprenglinge ausgezeichneter Laven an. Vorher prüfte er den Analysengang nochmals an Testgemischen und durch Makroanalyse.

Einen Oligonspat mit 70% Quarz als Gangart analysierte 1935 *R. Reissner*[12] im Wiener Mineralogischen Universitätsinstitut. Von den 10 mg Mineralsubstanz waren demnach nur 3 mg Carbonatmaterial, der Rest bestand aus Gangart.

Gleichfalls 1935 und 1936 veröffentlichte *K. Schoklitsch*[13] im Mineralogischen Institut der Grazer Universität Mikroanalysen von Silikaten. Das Verfahren wurde teils mit Testlösungen, teils mit durch Makroanalyse in ihrer Zusammensetzung genau bekannten Mineralien, nämlich geschlämmter Roterde und Omphazit, geprüft.

1936 und 1937 arbeitete *F. Hecht*[14] einen Mikroanalysengang für Silikate aus, der später an Mineralien geprüft wurde, von denen Makroanalysen bekannt waren. Diese Methoden wurden von *Hecht* und später von *Edith Kroupa* auf südwestafrikanische vulkanische Gläser und Lavaeinsprenglinge angewendet.

E. Dittler und *R. Reissner* analysierten Diamanten durch Mikroverbrennung[15].

Der tschechische Forscher *R. Nováček*[16] untersuchte sekundäre Uranmineralien und bediente sich dabei weitgehend der Analysenvorschriften von *Hecht* und Mitarbeitern. Er bestimmte so die formelmäßige Zusammensetzung von Joachimsthaler Johannit, Uranopiliten von Cornwall, Johanngeorgenstadt, Přibram, Joachimsthal, ferner von Cuprosklodowskiten und Zippeiten von Joachimsthal. Diese Arbeit war ein eindringlicher Beweis für den Wert mikroanalytischer Methoden in der Mineralogie.

Uranmineralien aus Norwegen wurden nach den Methoden von *Hecht* auch von dem norwegischen Chemiker *Ernst Føyn* mikroanalysiert[17].

E. Gleditsch und *R. Bakken*[18] arbeiteten Methoden zur Bestimmung von UO_2 und UO_3, aber auch anderer Bestandteile, in verschiedenen Schichten einzelner Cleveitkristalle aus.

Die meisten der erwähnten Analysen wurden wegen Materialmangels mikromethodisch ausgeführt und erlaubten die Ermittlung von Mineralzusammensetzungen auch in solchen Fällen, wo dies sonst überhaupt nicht möglich gewesen wäre. Während dasselbe auch für die von *Hecht*[2] analysierten Ceylonthorianite gilt, von denen nur stecknadelkopfgroße Kristalle vorlagen, traf es nicht bei allen Pechblende- und Uraninitanalysen dieses Autors zu. In diesen Fällen wurde die Mikroanalyse wegen der großen Zeit- und Reagenzienersparnis gewählt.

Eine besondere Anwendung fand die Mineral-Mikroanalyse in der Geologie, und zwar zur Bestimmung des geologischen Alters radioaktiver Mineralien nach der sogenannten „Bleimethode". Diese beruht auf dem Zerfall des in gewissen Mineralien vorkommenden Urans und Thoriums. Man kann daher aus dem Prozentgehalt dieser Elemente sowie des Endproduktes des radioaktiven Zerfalls in Form von Blei unter gewissen Voraussetzungen das Alter dieser Minerale berechnen, da die Zerfallszeiten der Elemente Uran und Thorium bekannt sind. Aus dem Uran mit dem Hauptisotop 238 entsteht im wesentlichen ^{206}RaG, aus dem Thorium, das praktisch ein Reinelement darstellt, das ^{208}ThD. Man kann nun aus

einer chemischen Atomgewichtsbestimmung, exakter jedoch nur mittels massenspektrographischer Untersuchung des isolierten Bleis nachweisen, ob es rein radioaktiven Ursprunges ist oder ob etwa gewöhnliches Blei, also das Mischelement mit dem Atomgewicht 207,21, bei der Bildung des Minerals in dieses mitaufgenommen worden ist. Nur im ersteren Fall liefert die chemische Analyse verläßliche Resultate. Das Prinzip dieser Zeitmessung ist das einfache „Sanduhrprinzip": Aus der Menge des abgelagerten bzw. entstandenen Endstoffes Blei und der Menge der Ausgangsstoffe Uran und Thorium kann man, da die Bildungsgeschwindigkeit bekannt ist, auf die Bildungsdauer schließen. Wenn also primär gebildete (nachträglich nicht mehr veränderte) Uran- oder Thoriumminerale vorliegen und das Mikroskop das Fehlen sulfidischer Beimengungen erweist, ist die Wahrscheinlichkeit, daß das Blei rein radioaktiven Ursprunges ist, sehr groß und man kann auch ohne Atomgewichtsbestimmung oder Isotopenbestimmung mit einiger Sicherheit das Alter des betreffenden Minerals berechnen.

Weniger sicher ist die Anwendung der Bleimethode auf die sogenannten schwach radioaktiven Minerale mit wenigen Hundertstelprozent Uran und Blei, insbesondere metamikte Mineralien, wie z. B. Allanite (Orthite).

Von *Edith Kroupa* sowie *F. Hecht* und dessen Mitarbeitern *Korkisch* und *Grünwald*[19] sowie in jüngster Zeit von *F. E. Korkisch* und *Olga Rigele*[20] wurden nun Methoden zur Mikrobestimmung der radioaktiven Elemente Uran, Thorium sowie des Bleis in den schwach radioaktiven Mineralien der seltenen Erden und des Zirkons ausgearbeitet, das heißt also für Fälle, wo die genannten Elemente in Beträgen von nur Zehntel- oder Hundertstelprozenten vorkommen. Insbesondere wurden Allanite, Monazite und Zirkone berücksichtigt; alle diese Minerale wurden in ihrer Zusammensetzung genau durch Testgemische nachgeahmt. Das Uranylnitrat wird dabei aus dem Gemisch der anderen Bestandteile schon zu Beginn des Analysenganges ausgeäthert, eine Methode, auf die zuerst *Ellen Gleditsch* hingewiesen hat und die seit den Arbeiten von *Hecht* und Mitarbeitern neuerdings vielfach allgemein angewendet wird[21]. Bei den radioaktiven Mineralien ist auch das Studium der Verwitterungserscheinungen von großer Wichtigkeit, da für Altersbestimmungen nur frische, also unveränderte Mineralien herangezogen werden dürfen. *Hecht*[22] konnte feststellen, daß bei der Untersuchung primärer Uraninitkristalle von Morogoro (im ehemaligen Deutschostafrika) das Blei-Uranverhältnis sich in den einzelnen, zur Oberfläche der Kristalle parallelen Zonen nicht als konstant erwies. In den äußeren Schichten kam es zu einer Anreicherung von Blei oder, was dasselbe bedeutet, zu einer Verarmung an Uran gegenüber den Zentralpartien. Solche Analysen von Kristallschichten sind meist wegen der Kleinheit der Kristalle nur mit Hilfe mikroanalytischer Methoden durchführbar. Aber auch wenn die betreffende Mineralprobe

zwar einige Gramm schwer ist, jedoch nur Hundertstel- oder Zehntelprozente an Blei, Uran oder Thorium enthält, müssen nach Anreicherung der betreffenden Elemente die Trennungen von Verunreinigungen und die Endbestimmungen mikroanalytisch erfolgen. Die Anreicherung des Bleis in den äußeren Schichten konnte von *Hecht* auch in Uraniniten von Connecticut, im Uraninit von Wilberforce und von *H. V. Ellsworth* an einem kanadischen Uraninit von Villeneuve nachgewiesen werden[23].

Es muß betont werden, daß es für die geologische Zeitmessung nicht unbedingt auf die Festlegung einer absoluten Zeitskala, ausgedrückt in Jahrmillionen, ankommt, sondern daß es für alle praktischen Zwecke ausreicht, den verschiedenen geologischen Epochen ganz bestimmte Bleiverhältnisse, diese aber möglichst genau, zuzuordnen. Unter „Bleiverhältnis" (englisch "lead ratio") versteht man im Sinne der häufig verwendeten Annäherungsformel den Quotienten $\frac{\mathrm{Pb}}{\mathrm{U} + k \cdot \mathrm{Th}}$. Es ist noch strittig, ob k, das — einfach ausgedrückt — das Verhältnis der Bleierzeugungsfähigkeit des Thoriums zu der des Urans darstellt, = 0,25 oder 0,36 zu setzen ist. Bei reinen Uranmineralien fällt dieser Faktor glücklicherweise fort. Wenn man das Bleiverhältnis mit 7600 multipliziert, erhält man ein annäherndes Alter des Minerals in Jahrmillionen. Bei geologisch alten Mineralien muß man jedoch die Tatsache berücksichtigen, daß das schneller zerfallende Aktinouran bei der Entstehung des Minerals in größerem Prozentsatz beigemengt war, und deshalb Korrekturfaktoren anbringen, die das berechnete Alter verkürzen. Die ältesten gefundenen radioaktiven Minerale sind eine karelische Pechblende und ein Monazit von Manitoba in Kanada, letzterer von *Edith Kroupa*[24] und *O. B. Muench*[25] übereinstimmend analysiert. Dessen Alter beträgt nach der Rechnung über 1900 Millionen Jahre. Etwa gleiches Alter scheint ein von *H. V. Ellsworth*[26] analysierter Uraninit von derselben Lagerstätte (Huron Claim, Manitoba) zu haben. Man setzt dieses Alter von rund zwei Jahrmilliarden gewöhnlich gleich dem Zeitraum, der seit Bildung der festen Erdoberfläche verstrichen ist. Es scheint übrigens, daß die Bildung von Uranmineralien an bestimmten Lagerstätten periodisch mit Abständen von vielen Jahrmillionen sich erneuert hat[27]. Das Problem der geologischen Zeitmessung mittels des radioaktiven Zerfalls ist in Wirklichkeit verwickelter, als es hier kurz dargestellt werden kann. Wenn Leitfossilien fehlen, kann die Altersbestimmung mit Hilfe des Bleiverhältnisses Aufschluß über die geologische Formation geben, der das Gestein angehört, das die betreffenden Mineralien enthält. Es sei noch erwähnt, daß zwischen der Wiener Forschungsstätte und dem amerikanischen „Committee on the Measurement of Geologic Time" vor dem Ausbruch des zweiten Weltkrieges vereinbart worden war, gegenseitig Testgemische auszutauschen

und die Analysenmethoden wechselseitig zu überprüfen, wozu es aber nicht mehr kam.

Die angeführten Beispiele zeigen, daß die Mineral-Mikroanalyse grundsätzlich dort am Platze ist, wo nur winzige Kristalle oder Mineralmengen vorhanden sind oder wo es sich um die Untersuchung zonarer Verschiedenheiten handelt.

Vielfach wird von Mikrochemikern die Ansicht vertreten, daß man in Anbetracht der gleich großen Genauigkeit mikroanalytischer Methoden in jedem Falle der Mikroanalyse wegen der Ersparnis an Arbeit, Reagenzien und Zeit den Vorzug gegenüber makroanalytischen Methoden geben solle. Dem steht bei der Mineral-Mikroanalyse vorläufig die Tatsache im Wege, daß für jeden chemischen Mineraltypus erst mit Hilfe von Testmethoden ein exakter Analysengang ausgearbeitet werden muß. Es soll hier der Appell an die interessierten Fachkollegen gerichtet werden, diese Mühe im einzelnen Fall nicht zu scheuen. Es wäre auf diese Art doch in verhältnismäßig wenigen Jahren möglich, verläßliche Mikromethoden zu schaffen, deren sich im Bedarfsfalle der Mineraloge bedienen könnte.

Die Untersuchung zonarer Verschiedenheiten spielt nicht nur bei den radioaktiven Mineralien eine Rolle, sondern beispielsweise auch bei Tantalaten und Mineralien der seltenen Erden. Bei Flußspaten und Apatiten wird die Verteilung der seltenen Erden von Interesse sein.

Den Petrographen werden wahrscheinlich die Erscheinung der Kugelgesteine, Kugelgranite, Kugelnorite oder die Mineralien der Meteoriten interessieren, die sämtlich ein Anwendungsgebiet der Mikroanalyse bedeuten könnten. Bei der Kristallisation von Silikatschmelzen könnten Erscheinungen der Resorption oder Nichtresorption zuerst ausgeschiedener Kristalle, ferner Änderungen der Zusammensetzung von Mischkristallen im Verlaufe der Abkühlung studiert werden. Für die Kontrolle der Migration der Elemente und die Verfolgung von Verwitterungserscheinungen, ebenso für die Untersuchung von Staubproben aus hohen Schichten der Atmosphäre oder gar der Ionosphäre (Raketensonden!), wäre die Mikroanalyse in vielen Fällen von Wichtigkeit. Die Petrographie kennt Beispiele von Resorptionsphänomenen, die sich in einer Korrosion ursprünglicher Einsprenglinge im Dünnschliff vieler Gesteine verraten. *T. F. W. Barth*[28] führt an, daß man in Basalten und Diabasen sehr häufig charakteristisch resorbierte Olivine und auch Umhüllung der Olivine mit Pyroxensubstanz wahrnimmt. Diese Verhältnisse könnten mit Hilfe der ja vollkommen entwickelten quantitativen Silikatmikroanalyse verfolgt werden. *A. Holmes* hat sich der erwähnten, von *Hecht* und später von *Kroupa* ausgeführten Mikroanalysen vulkanischer Gläser in einer Arbeit über die Transfusion von Quarzxenolithen in alkalisch basischen und ultrabasischen Laven[29] bedient. Auch Zirkone und Titanite

als gesteinsbildende Minerale wären gute Untersuchungsobjekte für die Mikroanalyse. Die derzeitige Gesteinsanalyse gibt ja nur Pauschalanalysenzahlen, ohne die einzelnen Mineralien zu analysieren.

Eine bedeutende Hilfe für die Geochemie würde die quantitative Spurenbestimmung bedeuten, die keineswegs immer spektralanalytisch erfolgen muß. Es sind Fälle bekannt, wo Gallium in Gesteinen und Mineralien, aber auch in Wässern, rein chemisch-analytisch mit größerer Genauigkeit, als es vermutlich spektralanalytisch möglich gewesen wäre, bestimmt worden ist. *E. B. Sandell* hat 1947 die Fluoreszenz von Gallium-8-oxychinolat in Chloroformlösung zur Bestimmung dieses Spurenelementes in Silikatmineralien und Gesteinen benützt[30]. Bald darauf veröffentlichte *S. Lacroix* eine ähnliche Galliumbestimmungsmethode in Bauxiten und daraus erzeugten Aluminiumprodukten[31]. Nach diesem letzteren Autor ist es möglich, 1,4 bis 4,2 γ Ga mit einer Annäherung von 10% zu bestimmen. Kürzlich publizierte *E. B. Sandell* eine Methode zur Berylliumbestimmung in Silikatgesteinen[32]. *A. Gottlieb* und *F. Hecht* arbeiteten kolorimetrische Mikromethoden für die Bestimmung von Mangan und Chrom in Gläsern aus[33], die auch für Silikatmineralien anwendbar sind. *H. Schreiner*, *H. Brantner* und *F. Hecht* fanden auch eine Mikromethode für die kolorimetrische Bestimmung von Gold in Gläsern[34]. Selbstverständlich ist diese kurze Aufzählung einiger weniger Beispiele zur Illustration für die Spurenbestimmung in Silikaten in keiner Weise eine vollständige Darstellung aller bisherigen Bemühungen zur quantitativen Spurenbestimmung in Mineralen, zumal auf diesem Gebiet die Spektralanalyse Bedeutendes zu leisten berufen ist. Im Zusammenhang damit muß wohl noch erwähnt werden, daß die Mikroanalyse imstande wäre, die Anreicherung bestimmter Elemente für die spektrographische Bestimmung zu kontrollieren, womit gleichfalls der Geochemie ein Dienst geleistet wäre.

Zusammenfassung.

Es wird eine kurze Übersicht über die wichtigsten bisherigen Untersuchungen zur quantitativen Mikroanalyse gegeben, wobei die Einteilung nach chemischen Mineraltypen (verwandter chemischer Zusammensetzung) getroffen ist. Auch die chemisch-analytische Spurenbestimmung in Mineralien wird gestreift. Von diesen Arbeiten ausgehend werden verschiedene künftige Möglichkeiten besprochen, um durch Mikroanalyse mineralogische, petrographische und geochemische Probleme ihrer Lösung näherzubringen.

Summary.

A short survey is given of the most important previous studies for the quantitative microanalysis of minerals, whereby a division is secured according to chemical mineral types (related chemical composition). The chemical analytical determination of traces in minerals is also touched on. Proceeding

from these studies, various future possibilities are discussed, in order to bring solution closes to mineralogic, petrographic and geochemical problems through microanalysis.

Résumé.

On donne un aperçu rapide des recherches les plus importantes jusqu'à ce jour pour la microanalyse quantitative des minéraux. La classification y est faite d'après les types de minéraux de composition chimique voisine. De même, on envisage la détermination analytique des traces. Diverses possibilités d'avenir découlant de ces travaux sont discutées pour rapprocher les problèmes minéralogiques, pétrographiques et géochimiques de leur solution.

Diskussion.

H. *M. Blumer* (Basel, Schweiz): Mit wie kleinen Bleimengen kann die massenspektrographische Bestimmung des Isotopenverhältnisses durchgeführt werden?

H. *F. Hecht*: Dr. *A. O. Nier* in USA. hat solche Bestimmungen mit sehr geringen Bleimengen (Größenordnung Milligramme) durchgeführt (z. B. Absts. Papers, Div. Phys. Inorg. Chem., Am. Chem. Soc. Milwaukee Meeting. Sept. 1938, S. 97; J. Amer. Chem. Soc. **60**, 1571 [1938]; J. Applied Phys. **12**, 300 [1941]).

Literatur.

[1] *A. A. Benedetti-Pichler* und *F. Schneider*, Mikrochem., Emich-Festschrift, 1 (1930). — *H. Thurnwald* und *A. A. Benedetti-Pichler*, Mikrochem., **9**, 324 (1931); Z. analyt. Chem. **86**, 41 (1931); Mikrochem. **11**, 200 (1932).

[2] *F. Hecht*, Mikrochem. **10**, 45 (1931/32); **12**, 193 (1932/33). — *F. Hecht* und *W. Reich-Rohrwig*, Mikrochem. **12**, 281 (1933). — *H. Brantner* und *F. Hecht*, Mikrochem. **14**, 27, 30 (1933/34). — *W. Reich-Rohrwig*, Z. analyt. Chem. **95**, 315 (1933). — *F. Hecht*, Amer. J. Sci. [5] **27**, 321 (1934). — *F. Hecht* und *H. Krafft-Ebing*, Mikrochem. **15**, 39 (1934).

[3] *F. Hecht* und *E. Kroupa*, Z. anorg. Chem. **226**, 248 (1936).

[4] *E. Kroupa* und *F. Hecht*, Z. analyt. Chem. **102**, 81 (1935). — *F. Hecht* und *E. Kroupa*, Z. analyt. Chem. **106**, 82 (1936). — *E. Kroupa*, Mikrochem. **27**, 165 (1939).

[5] *A. v. Endrédy*, Z. analyt. Chem. **89**, 100 (1932).

[6] *A.-G. Hybbinette*, Ind. Engng. Chem., Anal. Ed. **17**, 654 (1945).

[7] *H. Hueber*, Mineralog. petrograph. Mitt. **43**, 84 (1932).

[8] *H. Alber* und *C. Benedicks*, Ark. Kemi, Mineral. Geol. **11** A, Nr. 6 (1933).

[9] *R. Treje* und *H. Alber*, Jernkontorets Annaler **117**, 457 (1933).

[10] *M. Shioiri* und *T. Nagahara*, J. Imp. Agricult. Experiment Station **2**, 161 (1933). — *M. Shioiri* und *S. Kanematsu*, J. Japanese Assoc. Mineral., Petrol., Economic Geologists **12**, 180 (1934).

[11] *I. Iwasaki*, J. Japanese Assoc. Mineral., Petrol., Economic Geologists **13**, 92 (1935).

[12] *R. Reissner*, Zbl. Miner., Geol., Paläont., Abt. A, 170 (1935).

[13] *K. Schoklitsch*, Mikrochem. **18**, 144 (1935); Mikrochem. **20**, 247 (1936).

[14] *F. Hecht*, Mikrochim. Acta (Wien) **2**, 188 (1937).

[15] *E. Dittler* und *R. Reissner*, Zbl. Miner., Geol., Paläont., Abt. A, 97 (1936).

[16] *R. Nováček*, Věstník Král. Čes. Spol. Nauk **2**, 1 (1935).

[17] *E. Føyn*, Norsk Geol. Tidskr. **17**, 197 (1938); Skrift. Norsk. Videnskaps-Akad. Oslo, I. Mat.-Naturv. Kl., Nr. 4 (1938).

[18] *E. Gleditsch* und *R. Bakken*, Mikrochim. Acta (Wien) **1**, 83 (1937). — *R. Bakken* und *E. Gleditsch*, Nord. Kemikermøde Förh. **5**, 200 (1939); Amer. J. Sci. **36**, 95 (1938).

[19] *E. Kroupa* und *F. Hecht*, Z. anorg. Chem. **236**, 181 (1938). — *F. Hecht* und *E. Kroupa*, Z. analyt. Chem. **106**, 82 (1936). — *E. Kroupa*, *F. Hecht* und *I. Th. Koss-Rosenqvist*, Mikrochem. **29**, 94 (1941). — *F. Hecht* und *F. Korkisch*, Mikrochem. **28**, 30 (1941). — *F. Hecht* und *A. Grünwald*, Mikrochem. **30**, 279 (1943).

[20] *F. E. Korkisch* und *O. Rigele*, Mikrochem. **35**, 365 (1950).

[21] *T. R. Scott*, Analyst **74**, 486 (1949).

[22] *F. Hecht*, Mikrochem. **10**, 45 (1931/32); Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien **140**, Abt. IIa, 599 (1931).

[23] *H. V. Ellsworth*, Amer. Mineralogist **15**, 458 (1930).

[24] *F. Hecht* und *E. Kroupa*, Z. analyt. Chem. **106**, 82 (1936).

[25] *O. B. Muench*, Bull. Geol. Soc. Am. **52**, 1925 (1941).

[26] *H. V. Ellsworth*, Amer. Mineralogist **16**, 569 (1931).

[27] *G. Kirsch* und *F. Hecht*, Z. anorg. Chem. **236**, 157 (1938).

[28] *T. F. W. Barth*, *C. W. Correns* und *P. Eskola*, Die Entstehung der Gesteine. Verlag J. Springer, Berlin. 1939.

[29] *A. Holmes*, Miner. Magazine **24**, 408 (1936).

[30] *E. B. Sandell*, Analyt. Chemistry **19**, 63 (1947).

[31] *S. Lacroix*, Analyt. Chim. Acta **2**, 167 (1948).

[32] *E. B. Sandell*, Analyt. Chim. Acta **3**, 89 (1949).

[33] *F. Hecht* und *A. Gottlieb*, Mikrochem. **35**, 329 (1950). — *A. Gottlieb* und *F. Hecht*, Mikrochem. **35**, 337, 523 (1950).

[34] *H. Schreiner*, *H. Brantner* und *F. Hecht*, Mikrochem. **36/37**, 1056 (1951).

Geochemical Laboratory, Chemical Institute, Faculty of Science, Nagoya University.

On the Revision of the Clarke Numbers of Copper and Zinc.

By

Ken Sugawara and Yoshimi Morita.

(Received July 18, 1950.)

Introduction.

Under "Clarke Number" we understand the weight percentages of the individual elements which make the outer shell crust of the earth with a thickness of 16 km, inclusive of the hydro- and atmospheres.

When it is considered that the lithosphere makes up 93,06% of the total mass of the three spheres here considered and further that the mass of igneous rocks is 95% of the lithosphere, the average percentages of the individual elements (especially the minor ones at least) in the igneous rocks can be taken for their *Clarke* numbers as they are given.

Thus, for a number of elements, their average percentages in igneous rocks were calculated by *F. W. Clarke* and *H. S. Washington*[1] in 1924, using upon the data available at that time, and they continue to be valid untill the present, but it is not true for others. For a number of elements, the data, which *Clarke* and *Washington* used, were not adequate to represent the whole range of the earth to be considered, because they came from only limited regions or they covered only a part of the whole representative species, while some of the earlier data were not so sure because for the imperfection of the analytical methods. Thus it is now much desired that the *Clarke* numbers of such elements be revised by taking into consideration the recent more reliable data obtained by the improved methods of analysis on samples from extended sources. This is why we try anew to discuss the problem of the *Clarke* numbers of copper and zinc.

Analyses were carried out mainly by the method of *E. B. Sandell*[2], improved in certain points by one of the present author *(Morita)*.[3] The samples of igneous rocks were provided mainly by Dr. *H. Kuno* and Mr. *K. Ishioka* of the Geological Institute, Faculty of Science, Tokyo University, to whom we tender our deepest thanks. We are also indebted to Prof. *E. Minami*, Chemical Institute of the same university, for his kind gift of the shale samples.

Copper.

Tables 1–4 give the result of the copper determinations which were carried out by *Morita* on 45 kinds of the representative Japanese igneous rocks (15 for the acidic, 15 for the neutral and 15 for the basic ones).

Table 1. Acidic Rocks of Japan.

No.	Sample	Cu (10^{-3} %)	Zn (10^{-3} %)	Cu/Zn
1	Aplite, from Shita-mura, Toyama Pref. .	0.1	1	0.1
2	Biotite-granite, from Yaku-shima Island, Kagoshima Pref.	0.2	6	0.03
3	Biotite-granite, from Kitakata-mura, Miyazaki Pref.	0.5	3	0.17
4	Biotite-granite, from Shirakawa-mura, Gifu Pref.	0.2	2	0.1
5	Biotite-granite, fromInabu-machi, Aichi Pref.	0.4	7	0.06
6	Biotite-adamellite, from Mure-mura, Kagawa Pref.	0.1	7	0.01
7	Biotite-hornblende-granodiorite, from Ikatachi-mura, Shiga Pref.	0.5	6.5	0.08
8	Gneissose biotite-hornblende-granodiorite, from Hosoiri-mura, Toyama Pref.	0.3	7	0.04
9	Quartz-porphyry, from Nikkô, Tochigi Pref.	0.3	3	0.1
10	Potash-liparite, from Manzô-yama, Shimoda, Shizuoka Pref.	0.1	1.5	0.07
11	Biotite-liparite, Lava of Mukô-yama, Niijima Island, Izu.	0.2	2	0.1
12	Hornblende-liparite, Lava of Seto-yama, Niijima Island, Izu.	0.2	3.5	0.06
13	Aphyric dacite, Young Somma Lava of Hakone Volcano, Kanagawa Pref.	0.7	5.5	0.13
14	Hypersthene-hornblende-dacite, Pumice of Amagi Volcano, Shizuoka Pref.	0.5	9	0.06
15	Hypersthene-dacite, Ôusu Lava of Usu Volcano, Hokkaidô.	1.1	9	0.12

The perusal of the result tells that (1) the copper content grows smaller with increase of acidity, (2) it does not exceeds 0.01% except in four kinds of basic rocks, and (3) 3.5×10^{-3}% is obtained as the average value of the whole Japanese igneous rocks, a value about one-third of the current *Clarke* number 0.01.

Here, it can not be overlooked that recently *E. B. Sandell* and his coworkers[4] analysed 54 kinds of the rocks sampled from six different regions of USA. and gave as the average copper value 7.4×10^{-3}%, a value considerably higher than ours. But the examination of their

data shows that the copper values from the Lake Superior Region (Minnesota and Michigan) surpass markedly those from the other regions they examined and moreover 29 samples, more than a half of the whole, came from the named region which is considered to be an area where

Table 2. Intermediate Rocks of Japan.

No.	Sample	Cu (10^{-3}%)	Zn (10^{-3}%)	Cu/Zn
1	Biotite-hornblende-quartz-diorite, from Miho-mura, Kanagawa Pref.	3	6.5	0.45
2	Gneissose biotite-hornblende-quartz-diorite, from Kinkazan, Miyagi Pref.	6.5	9.5	0.7
3	Diopside-hornblende-biotite-diorite, from Otomo-mura, Iwate Pref.	2	7	0.3
4	Sanukite (Bronzite-andesite), from Kiyama Kagawa Pref.	1.2	7.5	0.16
5	Pyroxene-andesite, Lava of Sakurajima Volcano, Kagoshima Pref.	1.7	9	0.2
6	Hypersthene-andesite, Somma Lava of Aso Volcano, from Nishi-ôno-mura, Ôita Pref.	1.2	7	0.17
7	Hypersthene-andesite, Lava of Ichino-ike, Norikura Volcano, Nagano Pref.	0.9	7.5	0.12
8	Hornblende-hypersthene-andesite, Lava of Mizusawa-yama, Haruna Volcano, Gumma Pref.	1.8	7	0.25
9	Two pyroxene-andesite, Lava of Nantai Volcano, Nikkô, Tochigi Pref.	3.5	9	0.4
10	Hornblende-two pyroxene-andesite, Lava of Yatsugatake Volcano, Nagano Pref.	4	10	0.4
11	Olivine-bearing two pyroxene-andesite, Temmei Lava of Asama Volcano, Nagano Pref.	4	10	0.4
12	Olivine-bearing two pyroxene-andesite, Central Cone Lava of Hakone Volcano, Kanagawa Pref.	7	8	0.9
13	Olivine-bearing two pyroxene-andesite, Middle Lava of Amagi Volcano, Shizuoka Pref.	6	10	0.6
14	Two pyroxene-olivine-andesite, Lava of Zaô Volcano, Yamagata Pref.	5.5	10	0.55
15	Anorthoclase-trachyte, from Tsurugiji-mura, Ishikawa Pref.	0.8	12.5	0.06

copper seems to be abnormally concentrated as shown by the occurence of a multitude of great copper mines. No doubt this circumstance affected their average copper value and made it too high.

It will be also worth mentioning that the results of our analyses of a series of samples from Korea, Manchuria and Europe gave similar values to the Japanese (Table 5).

In conclusion, we give a value less than 4×10^{-3} as the *Clarke* number of copper in place of the current one.

Table 3. Basic Rocks of Japan.

No.	Sample	Cu (10^{-3}%)	Zn (10^{-3}%)	Cu/Zn
1	Hornblende-gabbro-pegmatite, from Mt. Tsukuba, Ibaraki Pref.	2.5	9.5	0.25
2	Biotite-bearing hypersthene-augite-olivine-gabbro, from Kawai-mura, Gifu Pref.	1.0	9	0.11
3	Hypersthene-augite-hornblende-biotite-quartz-monzonite, from Torigoe, Iwate Pref.	10	10	1.0
4	Peridotite, from Miyagawa-mura, Nagono Pref.	2	8	0.25
5	Biotite-amphibolite, from Hosoiri-mura, Toyama Pref.	3.5	14	0.25
6	Basalt, Lava from the Summit of Mt. Fuji	20	12	1.7
7	Aphyric basalt, Somma Lava of Ôshima Volcano, Izu.	15	11	1.4
8	Hypersthene-basalt, Meiji-Taishô Lava of Mihara-yama, Ôshima Volcano, Izu.	14	11	1.3
9	Olivine-basalt, Old Somma Lava of Hakone Volcano, Kanagawa Pref.	7.5	8.5	0.9
10	Olivine-basalt, from the Summit of Mt. Ryôzen, Fukushima Pref.	2.5	8.5	0.3
11	Augite-olivine-basalt, the Lowest Lava of Amagi Volcano, Shizuoka Pref.	6	12	0.5
12	Augite-olivine-basalt, Lava of Ôshima Volcano, Hokkaidô	4.5	7	0.65
13	Olivine-quartz-dolerite, from Funagata-mura, Yamagata Pref.	4.5	14	0.3
14	Olivine-augite-dolerite, from Hongô-mura, Ishikawa Pref.	5	9	0.55
15	Nepheline-basalt, from Nagahama, Shimane Pref.	3.5	16	0.2

Table 4. Distribution of Copper and Zinc in the Three Different Groups of Japanese Igneous Rocks.

Group	Number of Samples	Average content		Cu/Zn
		Cu (10^{-3}%)	Zn (10^{-3}%)	
Acidic rocks	15	0.3_6	4.9	0.07
Intermediate rocks	15	3.2	8.7	0.37
Basic rocks	15	6.8	10.6	0.64
All samples	45	3.5	8.1	0.43

Table 5. Igneous Rocks from Abroad.

No.	Sample	Cu (10^{-3}%)	Zn (10^{-3}%)	Cu/Zn
1	Biotite-hornblende-aegirine augite-syenite, from Kan-Won Do, Korea	0.8	28	0.03
2	Aegirine augite-biotite-nepheline-syenite, from Kan-Won Do, Korea	0.4	16	0.02
3	Olivine-basalt, from Ham-Gyong Puk Do, North Korea	5	9	0.55
4	Olivine-dolerite, from Tungan Province, North Manchuria	4	8.5	0.45
5	Basanite, Lava of Wutalienchih Volcano, North Manchuria	3.5	12.5	0.3
6	Leucite-basanite, Lava of Monte Somma, Vesuvius, Italy	3.5	8	0.45
7	Liparite (Pitchstone), from Fennary, Morven, Scotland	2	9.5	0.2
8	Aphyric dacite, Pumice from Mono Craters, California, USA.	0.1	4	0.02
9	Basalt, from The Dalles, Oregon, USA.	2	15	0.13

Zinc.

The current *Clarke* number of zinc is 4×10^{-3}. According to our result on the Japanese igneous rocks (Tables 1–4) its value is always more than 4×10^{-3}% except in a few cases of acidic rocks and gives an average of 8.1×10^{-3}%. *E. B. Sandell* and his coworkers obtained 6.3×10^{-3}% for the acidic rocks, 13.0×10^{-3}% for the basic ones (all samples from USA.) and gave 9.7×10^{-3}% as the arithmetical mean of the both. The same American authors estimated the zinc value along another line, i. e. from the manganese content using the ratio 0.07 which was established for zinc and manganese oxide and obtained a value of 8×10^{-3}% which, however, is probably a little low, as they stated, because the silicious rocks contain usually more zinc than can be computed by the above ratio.

Considering these facts and also our result on the samples from Korea, Manchuria, and European countries where we obtained a series of values similar to the Japanese rocks, we can safely conclude that the *Clarke* number of zinc lies in the range 8 to 9×10^{-3}.

The Sequence of Copper and Zinc in Abundance.

Following the current *Clarke* numbers, copper exceeds zinc in abundance with a ratio 2.5, while, by our new values the sequence of their abundance must be reversed with a ratio less than 0.5. The latter sequence goes in harmony with a series of facts which were found in other lines of study.

(1) Law of *Oddo* and *Harkins*.

This law says that "an element with an even atomic number is more abundant than one with an odd number, which just precedes or succeeds it". Thus the law requires that the abundance of zinc with an even atomic number 30 be larger than that of copper, an odd element which precedes it. The requirement can be satisfied with the new sequence which we suggest here but not by the current one.

(2) The contents of copper and zinc in shales and soil samples.

The sequence, suggested above, was found to be also true for a number of the composite samples of shales from Japan and Europe, the analyses of which were carried out by one of the present authors *(Morita)* (see Table 6).

Table 6. Composite Samples of Shales from Japan and Europe.

No.	Sample	Cu (10^{-3}%)	Zn (10^{-3}%)	Cu/Zn
1	Mesozoic shale of Japan. Composite of 10 samples	5.5	10	0.55
2	Palaeozoic shale of Japan. Composite of 14 samples	4	10	0.4
3	Palaeozoic shale of Europe. Composite of 36 samples	6.5	13	0.5

On the other hand, when we examine the result of analyses by *Vinogradov*[5] on a series of soil samples from the Russian plain along 40° E. long., we find that the content of copper varies between 0.5×10^{-3} and 2.6×10^{-3}%, while that of zinc is 5×10^{-3}%, and again here zinc exceeds copper in abundance.

Summary.

The analyses, given here in tabular form, of various species of rocks, especially of Japanese, but also of other Asiatic, European and American origins, lead to a revision of the "Clark number" for copper and zinc. (This number represents the per cent by weight for an element in the outer 16 km layer of the carts surface.) The number for copper is lowered and that of zinc is raised so that, in contrast with previous opinions a weight superiority of zinc is assumed.

Zusammenfassung.

Die tabellarisch wiedergegebenen Analysen verschiedener Gesteinsarten, insbesondere japanischer, aber auch sonstiger asiatischer, europäischer und

amerikanischer Herkunft geben Anlaß, die „*Clarke*-Zahl" (worunter die Gewichtsprozente eines Elementes in der äußersten 16-km-Schicht der Erde verstanden werden) für Kupfer im Sinne einer Herabsetzung und für Zink im Sinne einer Erhöhung zu revidieren, so daß im Gegensatz zu bisherigen Anschauungen ein gewichtsmäßiges Überwiegen von Zink angenommen wird.

Résumé.

Les analyses redonnées en tableaux pour diverses sortes de roches, japonaises notamment et aussi pour des roches anciennes d'origine asiatique, européennes et américaines, fournissent l'occasion de reviser les «nombres de *Clark*» (d'après lesquels sont compris les pourcentages en poids d'un élément dans la croûte terrestre de 16 km d'épaisseur) pour le cuivre dans le sens d'une diminution et pour le zinc dans celui d'une augmentation. Il en résulte que contrairement aux idées antérieures, on adopte pour le zinc un tonnage passablement plus élevé.

Bibliography.

[1] *F. W. Clarke* and *H. S. Washington*, U. S. Geol. Survey, Prof. Paper **127** (1924).

[2] *E. B. Sandell*, Ind. Engng. Chem. Analyt. Ed. **9**, 464 (1937).

[3] *Y. Morita*, J. Chem. Soc. Japan **69**, 174 (1948).

[4] *E. B. Sandell* and *S. S. Goldich*, J. Geology **51**, 99, 167 (1943).

[5] *A. P. Vinogradov*, Pochvovedenie (Pedology) **1945**, 348; Chem. Abstr. **40**, 1892 (1946).

Aus dem Institut für Mikrochemie und Geochemie der Technischen Hochschule Graz.

Die photometrische Bestimmung kleiner Uranmengen mit Kaliumrhodanid*.

Von

Max Gerhold und Friedrich Hecht.

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 26. August 1950.)

Die für Uran bisher bekannten photometrischen Bestimmungsmethoden sind in der Praxis nur unter peinlichster Einhaltung bestimmter Arbeitsbedingungen anwendbar und deshalb für serienmäßige Untersuchungen weniger geeignet.

Im allgemeinen ist die Bestimmung des Urans mit Phenolsäuren (o-Oxybenzoesäure) nur dann durchführbar, wenn Eisen, organische Lösungsmittel, organische Säuren sowie freie Mineralsäuren vorher vollständig entfernt worden sind[1]. Hingegen führen die Reaktionen des Urans mit Gerbsäure oder Kaliumcyanoferrat(II), die als sehr empfindliche Nachweisreaktionen für Uran gelten, leicht zu kolloiden Lösungen. Für kolloide Lösungen gilt jedoch das *Lambert-Beer*sche Gesetz nur in Fällen, in denen die kolloiden Teilchen sehr klein sind, d. h. wenn die Lösungen nicht trüb sind und keinen oder nur einen schwachen *Tyndall*-Effekt zeigen. Da nun schon geringe Elektrolytzusätze ausflockend wirken oder zumindest die Lösung trüben können, wodurch die Extinktion so stark beeinflußt wird, daß photometrische Messungen ungenau oder sogar unmöglich werden, ist die Reproduzierbarkeit der Eigenschaften kolloider Lösungen auf einen sehr engen Bereich begrenzt.

Wohl lassen sich diese Einflüsse durch Verwendung von Schutzkolloiden bis zu einem gewissen Grad ausschalten, doch bleibt die Re-

* Die vorliegende Arbeit stellt den zweiten Teil der Diplomarbeit von *M. Gerhold* dar, die am 5. Dezember 1944 an der Technischen Hochschule Graz eingereicht und kurz darauf approbiert wurde. Vgl. Mikrochem. **35**, 359 (1950).

produzierbarkeit derartiger Bestimmungen immer noch mit Fehlern behaftet, besonders was den Einfluß der Zeit auf die Intensität der Färbung betrifft. Daher ist es nicht zweckmäßig, derartige Methoden zur serienmäßigen photometrischen Bestimmung kleiner Urangehalte heranzuziehen.

Unsere Untersuchungen verfolgten den Zweck, eine für Serienbestimmungen kleiner Urammengen geeignete photometrische Uranbestimmung auszuarbeiten, die nicht die den bisher bekannten Methoden anhaftenden Mängel aufweist.

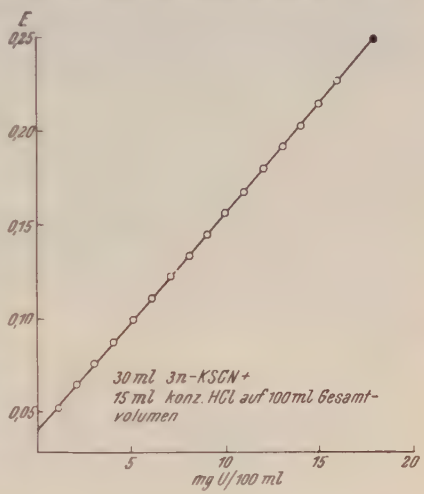


Abb. 1.

Die Bestimmung von Uran auf Grund der Gelbfärbung des Uranylrhodanids besitzt gegenüber den früher bekannten photometrischen Bestimmungsmethoden für Uran den Vorteil, daß Salz- und Säurezusätze ohne wesentlichen Einfluß auf die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Verfahrens sind und daß die Färbung keine zeitliche Veränderlichkeit der Extinktion aufweist. Ferner kann infolge der Löslichkeit des Uranylrhodanids in Amylalkohol und Äther die Bestimmung auch im Äther- bzw. Amylalkoholextrakt ausgeführt werden, wodurch sich die Empfindlichkeit der Bestimmungsmethode ganz beträchtlich steigern läßt. Dies ist besonders für die Erfassung kleiner Uranmengen von Bedeutung.

Experimenteller Teil.

Zusammenhang zwischen Urankonzentration und Intensität der Färbung: Um die Abhängigkeit der Intensität der Färbung von der Konzentration des Urans in der Untersuchungslösung aufzuklären, wurde mit Hilfe einer Uran-Standardlösung (1 mg U in 5 ml Lösung) unter Zusatz von 30 ml 3-n-Kaliumrhodanidlösung und 15 ml konz. Salzsäure eine Eichkurve aufgestellt.

Die Messungen wurden in einem zweizelligen lichtelektrischen Universalkolorimeter der Firma B. Lange, Berlin, mit Dunkelblaufilter B G 5 ausgeführt. Das Gesamtvolumen der Untersuchungslösung betrug 100 ml, die Schichtdicke 34 mm. Die erhaltenen Resultate sind in Abb. 1 dargestellt.

Die Farbreaktion zwischen Uransalzlösungen und Kaliumrhodanid folgt also streng dem *Lambert-Beer*schen Gesetz. Die aufgestellte Eichkurve zeigt bei Verwendung von gefiltertem blauem Licht geradlinigen Verlauf.

Einfluß der Konzentration von Kaliumrhodanid auf die Intensität der Färbung: Der Einfluß der Menge des zugesetzten Kaliumrhodanids auf die Farbintensität wurde an Lösungen untersucht, die konstante Mengen Uran (2 bzw. 6 mg U in 100 ml Gesamtvolumen) und Salzsäure (15 ml konz. HCl auf 100 ml Gesamtvolumen), jedoch wechselnde Mengen von Kaliumrhodanid enthielten.

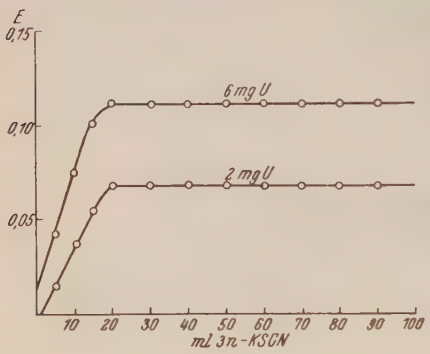


Abb. 2.

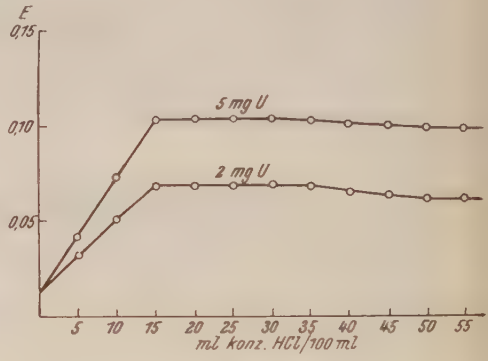


Abb. 3.

Die Versuchsergebnisse (Abb. 2) zeigen, daß nach Erreichen des Extinktionsmaximums bei 20 ml 3-n-KSCN-Lösung in 100 ml Gesamtvolumen die Farbintensität einen konstanten Wert besitzt. Trotzdem ist es günstig, größere Rhodanidkonzentrationen anzuwenden, als sie dem gefundenen Maximalwert entsprechen, da ein Überschuß von Kaliumrhodanid einen günstigen Einfluß auf die Stabilität der Färbung ausübt.

Einfluß der Konzentration der Salzsäure auf die Farbintensität: Um den Einfluß des Säuregehaltes auf die Stabilität des gefärbten Komplexes zu untersuchen, wurden Lösungen, die 2 bzw. 5 mg Uran und 25 ml 3-n-Kaliumrhodanidlösung in 100 ml Gesamtvolumen enthielten, mit wechselnden Mengen konz. Salzsäure ($D = 1{,}124$) versetzt.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 3 zusammengestellt und zeigen, daß sich für einen bestimmten Urankonzentrationsbereich ein Extinktionsmaximum ausbildet, für das die Unabhängigkeit der Farbintensität von der zugegebenen Säuremenge über einen größeren Bereich charakteristisch ist. Die maximale Färbungsintensität tritt bei Verwendung von 15 bis 35 ml konz. Salzsäure ($D = 1{,}124$) auf.

Die Bestimmung läßt sich gleich gut in salpetersaurer, essigsaurer und schwefelsaurer Lösung ausführen.

Einfluß der Zeit auf die Stabilität der Färbungsintensität: Die Zeitdauer der maximalen Färbungsintensität des Uranylrhodanids ist für die serienmäßige photometrische Bestimmung des Urans von erheblicher Bedeutung. Die maximale Farbintensität tritt bei Zimmertemperatur ungefähr 1 Min. nach der Säurezugabe auf und bleibt während 30 bis 40 Min. völlig konstant. Erst nach 10 bis 12 Stunden konnte ein merkliches Abblassen beobachtet werden.

Die Abhängigkeit zwischen der Zeit und der Farbintensität ist in Abb. 4 wiedergegeben.

Durchführung des Verfahrens mittels unmittelbarer Photometrierung:

Standardlösung: Eine Lösung von 2,1095 g eisenfreiem Uranylnitrat $UO_2(NO_3)_2 \cdot 6\,H_2O$ in 1000 ml Wasser enthält ungefähr 1 mg Uran im Milliliter. Die genaue Bestimmung des Urangehaltes der Standardlösung erfolgte gravimetrisch als Uranyloxinat oder U_3O_8.

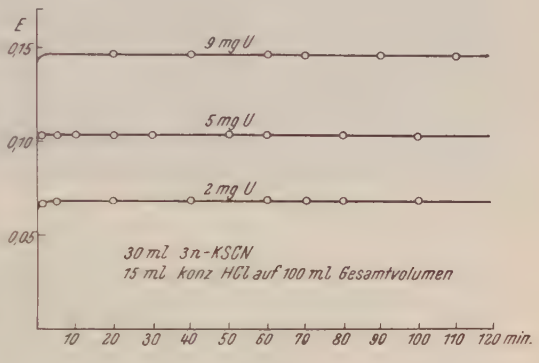


Abb. 4.

Verfahren: Man versetzt die Uransalzlösung mit 30 ml 3-n-Kaliumrhodanidlösung und 15 ml konz. Salzsäure ($D = 1{,}124$), füllt mit dest. Wasser auf 100 ml Gesamtvolumen auf und photometriert die gelbgefärbte Lösung nach 3 Min. unter Verwendung von Dunkelblaufilter B G 5 gegen dest. Wasser.

Da es sich beim Uranylrhodanid um eine nur schwach absorbierende Verbindung handelt, empfiehlt es sich in der Praxis, nach der Ausschlagmethode erhöhter Empfindlichkeit mit Vergleichslösung zu arbeiten. Benützt man als Vergleichslösung zur Einstellung des Nullpunktes die Lösung mit dem geringsten zu erwartenden Urangehalt und zur Einstellung des 100-Punktes eine Lösung mit dem größten Urangehalt, so erzielt man beste Ausnützung der Meßskala und größtmögliche Meßgenauigkeit.

Einfluß von Fremdionen: Eine im August 1947 von *J. E. Currah* und *F. E. Beamish* (Universität Toronto, Kanada) veröffentlichte Arbeit[2] bestätigte in ausgezeichneter Weise die von uns 1944 gefundenen Ergebnisse. Lediglich in der Abtrennung von störenden Elementen beschritten wir einen anderen Weg.

Die Bestimmung des Urans mit Kaliumrhodanid wird außer durch gefärbte Ionen, wie Kupfer, Eisen(III), Nickel, Kobalt, Chrom, Mangan usw., auch durch die Anwesenheit von Molybdän, Thorium, Wolfram und Vanadin gestört. Die genannten Autoren konnten den störenden Einfluß des dreiwertigen Eisens durch Reduktion zu zweiwertigem Eisen mit $SnCl_2$ soweit ausschalten, daß sich 0,5 mg U/100 ml noch neben 4 mg Fe/100 ml bestimmen ließen. Diese Methode führt jedoch nur in Abwesenheit von Mo, W, V und größeren Cu-Mengen zum Ziel.

Kupfer bildet nach Reduktion zu einwertigem Kupfer *unlösliches* Cu(I)-rhodanid, wenn es in größerer Konzentration als 80 mg Cu/100 ml Gesamtlösung vorhanden ist. Mo und W bilden nach Reduktion die bekannten gelben bzw. orangegefärbten Komplexe, die die Grundlage einer kolorimetrischen Bestimmung dieser Elemente bilden. Ebenso stört vorhandenes Vanadin. Hingegen ist die Uranbestimmung in Anwesenheit der beinahe 800fachen Thoriummenge durchführbar. Erst die Anwesenheit größerer Thoriummengen bewirkt eine leichte Verschiebung der Lichtabsorption, doch läßt sich diese Störung durch Zugabe eines Überschusses an Kaliumrhodanid beseitigen.

Extraktionsverfahren mit Amylalkohol oder Äther: Wie die angegebenen Versuchsergebnisse der amerikanischen Autoren zeigen, ist die Reproduzierbarkeit der Uranbestimmung mit Hilfe der Gelbfärbung des Uranylrhodanids in Anwesenheit störender oder gefärbter Ionen auf einen engen Bereich begrenzt. Nach eigenen Versuchen läßt sich durch Anwendung eines Amylalkohol- bzw. Ätherextraktionsverfahrens nicht nur die Empfindlichkeit der Methode wesentlich steigern, sondern man erreicht gleichzeitig eine vollständige Abtrennung von störenden Ionen.

Lediglich Mo-, W-Rhodanid und Titansalze lösen sich in Amylalkohol mit gelber bzw. Orangefarbe. Verwendet man jedoch Äther als Extraktionsmittel, so läßt sich die Bestimmung auch in Anwesenheit größerer Mo- und W-Mengen durchführen.

Die Untersuchungslösung wird in analoger Weise wie beim unmittelbaren Verfahren hergestellt und nach 5 Min. langem Stehen mit 15 ml Amylalkohol geschüttelt oder mit einer gleich großen Menge Äther extrahiert. Den Amylalkohol- oder Ätherextrakt photometriert man in der angegebenen Weise in einer 25-ml-Küvette, nachdem man zunächst mit Amylalkohol bzw. Äther im Meßkolben zur Marke aufgefüllt hat.

Zur serienmäßigen Uranbestimmung radioaktiver Minerale verschiedenen Ursprunges, bei denen der Gehalt an störenden Elementen sehr unterschiedliche Größe besitzen kann, wurde zur Abtrennung des Urans von den übrigen störenden Elementen die Löslichkeit des Uranylnitrates in Äther herangezogen.

Nach *F. Hecht* und *A. Grünwald*[3] wird der Eindampfrückstand der zu untersuchenden Lösung durch mehrmaliges Abrauchen mit Salpetersäure in Nitrate umgewandelt und nach Auflösen des Nitratgemisches in Ammoniumnitratlösung und konz. Salpetersäure in einem *Schacherl*-Extraktionsapparat extrahiert. Nach der Extraktion befindet sich das Uran vollständig im ätherischen Extrakt und kann dort nach dem hier beschriebenen Verfahren photometrisch bestimmt werden.

Auf diese Weise läßt sich Uran von allen störenden Begleitelementen quantitativ abtrennen. Daher eignet sich diese Uranbestimmung infolge ihrer Verläßlichkeit und Reproduzierbarkeit in ausgezeichneter Weise zur serienmäßigen Untersuchung radioaktiver Minerale.

Zusammenfassung.

Uran ist mit Kaliumrhodanid in stark salzsaurer Lösung bei Verwendung eines Blaufilters spektrophotometrisch bestimmbar.

Durch ein Extraktionsverfahren mit Äther ist eine Trennung von einer größeren Zahl störender Fremdelemente erreichbar.

Summary.

Uranium can be determined spectrophotometrically with potassium thiocyanate in strong hydrochloric acid solution; a blue filter is used.

Separation from a large number of interfering foreign elements can be accomplished by an extraction process with ether.

Résumé.

L'uranium peut se doser spectrophotométriquement avec le thiocyanate de potassium, en solution fortement chlorhydrique, par emploi d'un filtre bleu.

Par un procédé d'extraction à l'éther, on réalise une séparation d'un grand nombre d'ions étrangers gênants.

Literatur.

[1] *A. Müller*, Chem.-Z. **43**, 739 (1919); siehe auch Z. anorg. Chem. **109**, 235 (1920). — *P. Nath-Das Gupta*, J. Indian Chem. Soc. **6**, 763 (1929).

[2] *J. E. Currah* und *F. E. Beamish*, Analyt. Chemistry **19**, 609 (1947).

[3] *F. Hecht* und *A. Grünwald*, Mikrochem. **30**, 279 (1942).

Central Laboratory, National Coal Board, Manchester.

Micro Methods Applied to Industrial Materials in the Coal Industry.

By

C. E. Spooner.

With 2 figures.

(Received August 23, 1950.)

I intend in this paper to deal with the application of micro methods to industrial materials associated with the coal industry. The need for these methods arises for a number of reasons, the most obvious of which is when the amount of sample available is small as for example often happens in work dealing with airborne dust. The speed of the determination being much faster on the micro scale than it is on the macro finds a number of applications and when it does the possibility of taking a truly representative sample must be rigorously considered. Provided these precautions are observed it is possible to carry out the proximate and ultimate analysis of coal on the micro scale. In fact details are given for the determination of moisture, ash and volatile matter, also for carbon, hydrogen and sulphur. In the case of ash analysis colorimetric methods are proving a boon and greatly reducing the time spent on a determination, as well as improving the accuracy. In mine air analysis it has been found that the adoption of a micro technique to the determination of iodine increases the sensitivity of the iodine pentoxide method for the determination of carbon monoxide by at least ten times and enables concentrations of 0.0001% to be determined with confidence.

Sampling.

Coal is a heterogeneous material and the constituent which varies most and has the biggest effects on all other determinations is the ash content. The industrial product mostly consists of a collection of pieces each of different ash content which may or may not be intimately mixed. The ash content of the individual pieces varies for some coals

from as low as 1% to pieces approaching 100% ash content, whereas in other coals the spread is much smaller. In some cases on the other hand the lowest ash contents of the individual pieces may be much higher approaching 15 to 20%.

It is possible to develop a mathematical relationship between the weight of sample taken for a particular determination, the size to which the sample has been crushed and the error that may be introduced by the heterogeneity of the sample. This has been done for British coals by the British Standards Institution and is based on the Size Weight Ratio Theory which was originally put forward by *E. G. Bailey*.[1] In applying this theory to British coal the British Standards Institution assumed that coal should be regarded as a mixture of two types of particles, one of 100% ash and the other of 4% ash. This will not be true for any one particular sample but it will give an approximation to the maximum error which may be introduced in any sample.

This theory can be applied to micro samples to ascertain the fineness to which a coal should be ground so as not to introduce too great an error when a sample of 10 mg is taken for analysis. For a coal of 10% ash, the determined ash will be correct to $\pm 1.0\%$ 99 times in 100 if the sample is crushed through 100 B. S. mesh and $\pm 0.5\%$ 99 times in 100 if it is crushed through 170 B. S. mesh and $\pm 0.25\%$ with the same propability if the sample is crushed through 300 B. S. mesh. The probable error in each case will be approximately one quarter of that given for the 99% probability. Thus the accuracy necessary for routine work can be obtained if the sample from which the 10 mg is taken is crushed through 120 B. S. mesh and for special cases an increased accuracy can be obtained by crushing the sample through 240 B. S. mesh. It will of course be necessary to see that the bulk sample is thoroughly mixed before the 10 mg sample is taken and also that all fractions have been equally pulverised.

It must not be assumed from this that micro methods are recommended for routine analyses in the coal industry, in fact few routine laboratories are equipped for this type of work and it is not advisable that they should be, but in the special cases when it is necessary to use micro methods an idea of the accuracy of the result obtained can be given.

Proximate Analysis.

The determination of moisture in coal on a micro scale is best carried out by a direct method, that is one in which the moisture driven off from the coal by heating at 105 to 110° C is collected and weighed as such. The chief reason for this is because dry coal is a very powerful dessicant and unless rigorous precautions are taken to prevent the dried

coal from re-absorbing moisture a low result will be obtained. These precautions are difficult to apply on the micro scale and are not necessary if the water driven off is weighed directly. The direct determination of the water also obviates the need for other precautions in preventing the coal from being oxidised and in addition is free from a slight error introduced by the adsorption of gases by the dried coal. In carrying out the determination the coal sample is heated in a tube, through which nitrogen is passed and the liberated water collected in a tared absorption tube packed with anhydrone attached to the exit end. The tube is maintained at 110 ± 5^0 C by any of the usual means such as a gas heated *Pregl* regenerating block or a toluene bath, and a 5 to 10 mg sample requires about 5 min. heating to drive off all the moisture.

The ash content of a coal is determined by combustion of the organic matter at a temperature of 800^0 C and weighing the inorganic material which remains. The combustion should be spread over a period of 5 min. for a 5 to 10 mg sample so as to avoid loss of ash by decrepitation and in some cases it may even be necessary to surround the boat with a platinum shield for coals which decrepitate badly. The combustion is best carried out in a tube furnace maintained at 800^0 C with oxygen passing through the tube and a pusher arrangement for pushing the boat slowly into the hot zone.

The proximate analysis of a coal can be completed by the determination of the volatile matter which is carried out by heating the coal sample under standardised conditions in a tube furnace with oxygen free nitrogen passing down the tube. A temperature of 925^0 C should be used for this determination and the heating conditions of the micro method standardised to give the same result for a series of coals as the macro method.

Ultimate Analysis.

The ultimate analysis of a coal can be carried out using the empty tube technique previously described by the author in collaboration with *R. Belcher*[2]. If it is necessary to determine the sulphur content of a coal by this method then the combustion of the coal should be carried out a temperature of 1350^0 C but if this element is not required a temperature of 800^0 C can be used. I do not propose to describe this method in detail as it has already been described a number of times and a paper dealing with a development of it is being given at this conference. I will however describe a technique which demonstrates its versatility and which. I adopted for the complete analysis of a sample using only 5 to 10 mg.

The need for this procedure arose when it was necessary to analyse the samples obtained from a Dutch State Mines Sedimentation Apparatus.

The weight of sample available was in some cases only 5 mg so a comprehensive method of analysis on a single sample had to be adopted. The apparatus used consisted of a tube furnace shown in Fig. 1 maintained at 1350° C and through this passed a porcelain tube. At the inlet side of the furnace the combustion tube protruded 22.5 cm and the end was closed with a rubber bung carrying a T-piece through which passed a silica pusher, the side arms of the T-piece serving as inlet for the oxygen supply. The exit end of the tube was not beak ended but closed with a rubber bung, through which passed a glass tube for connection to the absorption tubes. A split aluminium block was made which could be placed round the inlet side of the combustion tube and this carried a thermometer in a specially drilled hole.

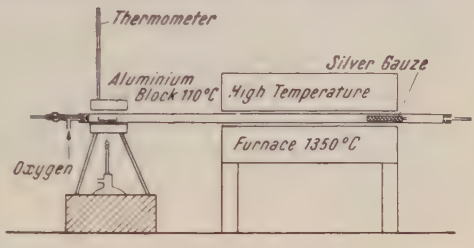


Fig. 1. Coal analysis Apparatus.

In carrying out a determination the sample is weighed into a platinum boat and placed about 7.5 cm into the inlet end of the combustion tube. The aluminium block is placed round the region of the combustion tube carrying the boat and heated to 110° C. Pure dry oxygen is passed through the combustion tube at a rate of 50 ml/min. having previously passed through a preheater, flowmeter and purification train. At the exit end of the combustion tube a tared absorption tube is attached packed with anhydrone. After 5 min. all the moisture will have been driven from the coal so the absorption tube is disconnected and weighed. It is realised that during this process the coal sample will have oxidised slightly but experiments have shown that under these conditions oxidation does not proceed far enough to produce any additional water from the coal.

On disconnecting the moisture absorption tube, two absorption tubes are connected to the exit end of the combustion tube for the determination of hydrogen and carbon, they being packed with anhydrone and soda asbestos backed with anhydrone in the usual manner. Similarly a roll of silver gauze is inserted to a position on the exit side of the combustion zone previously fixed as being suitable for the absorption of all the oxides of sulphur. By means of the pusher the boat containing the sample is pushed to a position near the inlet of the furnace where the volatile matter starts to be distilled and being carried forward with the oxygen flow is burnt in the furnace. During the next 6 min. the boat is gradually pushed into the hot zone of the furnace and left there for a further 4 min. to drive off all the sulphur from the ash. At the end

of this period the absorbers are disconnected, wiped, cooled and weighed, the boat containing the ash is removed, cooled and weighed and the weight of ash obtained by difference. The sulphur may be calculated from the silver sulphate produced by withdrawing the roll of silver gauze, dissolving off the silver sulphate and either titrating the silver that goes into solution or determining the loss in weight of the roll of gauze.

Colorimetric methods are finding application more especially in the analysis of coal ash. Phosphorus is perhaps one of the most frequently determined constituents and the successful development of a colorimetric method for this determination by *R. Belcher* which starts with 50 mg of ash and enables the determination to be completed in about 1 hr. was a big improvement on the previous standard method. Investigations are now being made into the possibility of developing a colorimetric method for arsenic which will determine this constituent to the accuracy which it is necessary for it to be determined in Britain. It is hoped to develop other colorimetric methods as time permits and the need arises.

Gas Analysis.

Gas analysis is another branch of analysis of major importance to the coal industry. Occasionally it may be necessary to analyse small quantities of gas as for example that which is adsorbed and given off under certain conditions by a piece of coal and I am at present investigating the possibility of using the *Sutton* apparatus and technique[3] for this purpose. We do, however, as routine practice have to determine carbon monoxide in mine air to an accuracy of 0.001% and it would be a big step forward if it could be determined to an accuracy of 0.0001%. The standard method for carrying out this determination is to determine the iodine liberated when the carbon monoxide reacts with iodine pentoxide. As the percentage of carbon monoxide is so very small the determination of the iodine liberated is certainly a micro determination so that one or two remarks on this determination of iodine will not be out of place.

The main point noticed was that irrespective of whether starch was used as the indicator or sodium glycollate it was impossible for the human eye to see the colour developed below a certain intensity. This is illustrated on Fig. 2 which shows that at 10° C the eye just fails to see the colour developed by 0.026 ml of N/500 iodine when present in 7 ml of potassium iodide solution, at 20° C this has increased to 0.033 ml and at 30° C 0.05 ml of N/500 iodine solution. Similarly the Spekker absorptiometer just fails to detect any colour developed by 0.015 ml, 0.021 ml, 0.035 ml at temperatures of 10° C, 20° C and 30° C respectively.

Thus a limit is placed on the accuracy of this determination either by the failure to develop a colour or by the lack of an instrument sufficiently sensitive to detect it. In practice this limit may not be as bad as shown because the iodine pentoxide tube tends to give a small spontaneous evolution of iodine and photochemical decomposition of the potassium iodide solution also tends to produce a small amount of iodine so that the threshold value of the iodine is lowered. However under certain conditions it is possible to get an error of the order given.

A technique whereby this error is considerably reduced and whereby it is possible to titrate iodine of the order of 0.003 ml of N/500 iodine solution has been developed. The procedure adopted is to absorb the iodine in 50 mg of dried silica gel $^1/_{40}''$ to $^1/_{80}''$ instead of the 7 ml of 4% potassium iodide solution usually used. This weight of silica gel is contained in a small tube which is attached to the exit from the iodine pentoxide tube, the silica gel being supported on an asbestos plug. At the end of the passage of the gas from the iodine pentoxide tube this small tube is detached, the silica gel tipped into a Durham tube and 0.07 ml of a solution containing 1% starch and 0.1% potassium iodide added. The iodine is then titrated with N 500 potassium thiosulphate solution using a micrometer syringe burette. It is possible using this technique to determine accurately carbon monoxide concentrations to 0.0001% using samples of 300 ml.

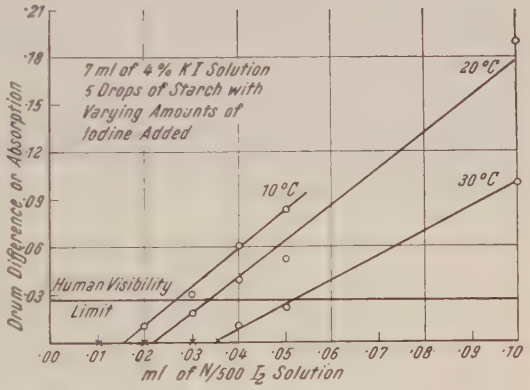


Fig. 2. Colour with Starch and Iodine.

Conclusions.

It will thus be seen that provided precautions are taken to obtain a representative sample micro methods can be applied with confidence to coal analysis. At times these are the only methods possible for the analysis of products from research projects. In other cases a great saving of time is possible by transforming a macro determination to the micro scale. Whereas the analysis of mine airs provides a case where the application of micro methods has extended the scope of a determination and reduced the limiting determinable figure by ten times.

Summary.

This paper deals with the application of micro methods to industrial materials associated with the coal industry. The need for these methods arises firstly, when the amount of sample available is small, as often happens in research investigations, and secondly when the speed of the determination is much faster on the micro scale than it is on the macro.

When the second condition applies it is necessary to ensure that the micro sample taken is a true representative sample, because coal is a heterogeneous material. Details are given of the size to which the coal should be crushed so that the probable error due to heterogeneity is within the necessary limits. Experimental details are given for the determination of moisture, ash and volatile matter in coal, also for carbon, hydrogen and sulphur, and a technique is described whereby all these constituents are determined on one micro sample.

Reference is made to the application of colorimetric methods in coal ash analysis and also to the adoption of micro gas analysis technique. A technique is described which enables carbon monoxide to be determined exactly in a 300 ml sample when it is of the order of 0.0001%. In developing this method an investigation was made into the various sources of error which may apply in the micro titration of iodine and a technique is described whereby iodine equivalent to 0.003 ml of N/500 iodine solution can be titrated exactly.

The methods described therefore cover the range of micro-gravimetric, colorimetric and micro-volumetric, and all have found application in the coal industry.

Zusammenfassung.

Der vorliegende Bericht befaßt sich mit der Anwendung von Mikromethoden zur Untersuchung von Substanzen, die im Rahmen der Kohle-Industrie anfallen. Ein Bedürfnis hierfür liegt einerseits dann vor, wenn nur geringe Mengen Untersuchungsmaterial verfügbar sind, wie es bei wissenschaftlichen Forschungsarbeiten oft zutrifft, anderseits dann, wenn die Mikroanalyse Zeitersparnis mit sich bringt.

Besonders in letzterem Fall muß man sich darüber Gewißheit verschaffen, daß die verwendete Mikroeinwaage eine gute Durchschnittsprobe darstellt; denn Kohle ist ein heterogenes Material. Details über die Probenahme werden mitgeteilt. Für die Bestimmung der Feuchtigkeit, des Aschegehaltes, der flüchtigen Anteile der Kohle, ebenso auch des Gehaltes an Kohlenstoff, Wasserstoff und Schwefel werden Einzelheiten angegeben und ein Verfahren zur Bestimmung aller dieser Bestandteile in einer einzigen Einwaage beschrieben.

Ferner wird über die Anwendung der Kolorimetrie und der Mikrogasanalyse zur Aschenuntersuchung berichtet. Ein Verfahren zur genauen Bestimmung von Kohlenmonoxyd in 300 ml Gas bei einem Gehalt in der Größenordnung von 0,0001% wird beschrieben. Bei der Ausarbeitung dieser Methode wurden die verschiedenen Fehlerquellen der mikrojodometrischen

Bestimmung untersucht und eine Methode angegeben, womit noch 0,003 ml einer 0,002-n-Jodlösung genau titriert werden können.

Die beschriebenen Methoden berühren also das Gebiet der Mikro-Gravimetrie, der Colorimetrie und der Mikromaßanalyse und finden alle in der Kohlen-Industrie Verwendung.

Résumé.

Cette note traite de l'applicabilité des microméthodes aux substances industrielles associées à l'industrie du charbon. La nécessité de ces méthodes se fait sentir tout d'abord quand la quantité de matière accessible est petite comme c'est souvent le cas dans la recherche, ensuite, quand la vitesse du dosage est beaucoup plus rapide à l'échelle micro qu'à l'échelle macro.

Quand la seconde condition s'applique, il est nécessaire de s'assurer que le micro-échantillon prélevé est vraiment représentatif car le charbon est une substance hétérogène. On donne des détails sur le calibre auquel le charbon doit être écrasé pour que l'erreur probable due à hétérogénéité tombe entre les limites permises. On fournit les détails expérimentaux pour le dosage de l'humidité, des cendres, des matières volatiles dans le charbon, ainsi que pour le carbone, l'hydrogène et le soufre et une technique grâce à laquelle tous ces constituants se déterminent sur un seul microéchantillon.

On rappelle l'application des méthodes colorimétriques à l'analyse des cendres de charbon et l'adoption de la technique microanalytique des gaz. On décrit un procédé pour doser correctement l'oxyde de carbone dans un échantillon de 300 ml quand il est de l'ordre de 0,0001% par sa présence. En mettant cette méthode en oeuvre, on a fait une recherche sur les sources d'erreurs variées pouvant survenir dans le microdosage de l'iode et décrit une technique grâce à laquelle une quantité d'iode équivalente à 0,003 ml de solution N 500 pouvait être exactement titrée. Les méthodes décrites couvrent par conséquent les domaines de la microgravimétrie, de la micro-colorimétrie et de la micro-volumétrie et elles ont toutes trouvé des usages dans l'industrie charbonnière.

Discussion.

Mr. *W. Doran* (Liverpool, England): Of what material is the combustion boat made in the *Spooner* coal-combustion-analysis apparatus? Is there no risk of sulfur being fixed by the mineral contents of the coal during combustion analysis in the oxygen stream?

Mr. *C. E. Spooner*: The combustion boat is made of platinum.

Bibliography.

[1] *E. G. Bailey*, Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. **1**, 161 (1909).

[2] *R. Belcher & C. E. Spooner*, J. Chem. Soc. London (**1943**), 313.

[3] *T. C. Sutton*, J. Sci. Inst. **15**, 133 (1938).

From the Department of Botany of the University of Pennsylvania, Philadelphia, Pa., USA.

The Microchemistry of Toxicity.

By

William Seifriz.

With 1 Figure.

(Received June 6, 1950.)

One of the roles of microchemistry in biology and medicine is to help reduce all physiological and pathological phenomena to problems in protoplasm. Not until medical science has become the microchemistry of protoplasm can medical problems be said to have been solved or understood.

Among lower organisms none presents so large a mass of comparatively undifferentiated protoplasm as do the Myxomycetae or Mycetozoa, commonly known as the slime molds. They are excellent material for studies on protoplasm. When physiologically active much of the plasmodium is in a state of flow. Streaming continues unceasingly, except in times of dormancy. All of the protoplasm moves in one direction at one time, and then reverses. Reversal in the direction of flow occurs with remarkable regularity. These properties of flow serve to indicate the physiological state of the protoplasm.

Slime molds are among the most primitive forms of life. That they are claimed by botanists as Myxomycetae and by zoologists as Mycetozoa indicates their dual, plant-animal nature. This fact is both an advantage and a disadvantage. Experiments on a primitive form of life often lead to a better understanding of biological problems, but one must constantly keep in mind the question, how far studies on lowly organisms are applicable to higher animals. There is a further advantage in working on protoplasm which is non-cellular, namely the effect of a reagent can be directly observed through the microscope.

Material and Method.

The myxomycete which served as material in the present work is Physarum polycephalum. It is conveniently cultivated on wet filter

paper, kept in large glass chambers, and fed oatmeal. Subcultures are made by transferring bits of the parent plasmodium to glass coverslips coated with a film of water or a thin layer of agar. A glass slip with its subculture is inverted over a miniature moist chamber which may also serve later as a gas chamber. The volume of the chamber used in these experiments was 6.5 ml.

Protoplasm may be treated with reagents in one of two ways: it may be bathed in a gas or a solution, or the solution may be injected into it with the aid of a micropipette.

Over the past few years the protoplasm of Physarum has, in my laboratory, been treated with the following reagents: the salts of metals covering much of the periodic table, alkaloids, xanthine derivatives, barbiturates, amines, opiates, hydrocarbons, toxic gases, and a variety of familiar anesthetic agents such as chloroform, cyclopropane, nitrous oxide, and ethylene. From this work there have arisen certain general conclusions which are here presented.

Experimental Results.

Heavy Metals.

The toxic effects of the heavy metals on living tissues and on organisms as a whole have long been studied. I have reduced this problem to experimental results on slime mold protoplasm, and only those directly observed through the microscope. To these observations I have given a theoretical interpretation. If the metals of salts, chlorides or nitrates, are arranged in the order of their toxic effects on protoplasm the series become:

$$Li^{+} < Na^{+} < K^{+} < Rb^{+} = Cs^{+}$$

$$Ca^{++} < Mg^{++} < Sr^{++} < Ba^{++}$$

$$La^{+++} < Pb^{++} < Au^{+++} < Ag^{+} < Th^{++++}$$

It is better to group the ions into three lyotropic series and to stagger them, for such an arrangement better illustrates the facts, e.g., the bivalent Ca is less toxic than monovalent Rb and Cs, and trivalent La is considerably less toxic than divalent Sr and Ba.

Interpretations of lyotropic series are numerous. Valence and atomic weight are the first obvious correlations with toxic effects. From top to bottom and from left to right in the periodic table is the general rule for the increasing toxicity of the elements. When we attempt to interpret this general rule, we find all sorts of possible correlations which make tempting speculation and which may have some meaning, but how much, it is impossible to say. Thus, the position of an ion in the electromotive force series shows some correlation with toxicity. Five

highly toxic elements, Cu, Ag, Hg, Pb, and Au are grouped together in the emf series. Of possible significance is the second electronic ring, that adjoining the outer valence orbit. Thus, Ag, Pb, and Au are all highly toxic and all have 18 electrons in the second orbit. The significance of such a correlation would lie in the activity of the ions, on their tendency to form complex ions and to unite with atoms which are part of the protoplasmic structure. Resonance is another property of molecules which has come into the picture of late. With this the biologist can as yet do nothing, but the chemist, *Pauling*[1] finds resonance a likely factor in physiological activities.

There are still other properties of ions which are closely correlated with toxic action. The order of hydration of monovalent ions is, $Li > Na > K > Rb = Cs$; and for the divalent metals it is, $Ca > > Mg > Sr > Ba$. These are both the order of increasing toxicity. *Harned* and *Owen*[2] point out that an ionic field is $\frac{1}{r^2}$ and that hydration is in inverse ratio to the ionic radius. The radius of the non-toxic Li^+ ion is small enough to attract water molecules, whereas the large toxic Cs^+ ion cannot hold a water layer. The role of hydration is a shielding one. It determines whether or not a toxic ion can exert its effect, but it does not determine the innate toxicity of the ion; i.e. if an ion is in itself not toxic, the absence of a protective water layer cannot make it so. A hydrated layer can protect but it cannot activate.

Mobility is a measure of the activity of an ion and therefore must determine, in part, the nature of the reaction between ion and protoplasm. The order of mobilities of five monovalent ions is[3]:

Li	Na	K	Cs	H
33.4	43.5	64.6	68.0	315.0

and this is the toxicity order.

The thermodynamic properties of metals must be responsible for the toxicity of their salts. To what else can toxicity be due? But such an interpretation still leaves us ignorant of a complete understanding of toxic action, particularly that of a metal such as silver, which in the foregoing series ranks with thorium as one of the most poisonous of elements. It is, to be sure, a large ion, and not highly hydrated, but these two facts alone are not enough to establish its high toxicity. We may now add adsorption as a factor in toxicity and find in it an explanation of the highly poisonous action of silver. The order of increasing adsorbability of metals by charcoal is: $Na < K < Ca < Zn < La < < Cu < Hg < Ag$.

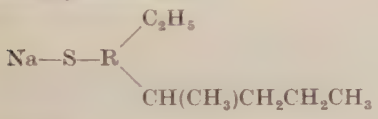
In attributing toxic action to the adsorbability of elements and to any one of numerous other "isosteric" properties[4, 5] we still have not

fully explained the extraordinary selectivity of protoplasm. Toxicity, in the last analysis, involves an interaction between the poison and a specific component of protoplasm. Particularly important is the pronounced tendency of the heavy metals such as Th, Ag, and Pb, to form covalent bonds, especially with atoms of sulphur, an important and abundant element in protoplasmic proteins[6].

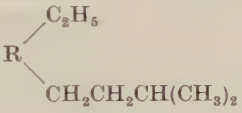
Organic Substances.

The effect of a toxic metal may be interpreted in terms of atomic structure, but the toxicity of organic compounds must be considered in relation to a larger unit. In chemical compounds of greater complexity, molecular pattern serves well in determining degree of poisonous action. This has proved true with xanthines[7], barbiturates[8], hydrocarbons[9], and alcohols[9]. If we here select just one of these, the barbiturates, the nice correlation between toxicity and molecular pattern can be seen.

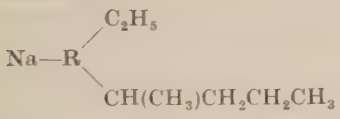
Sodium pentothal.



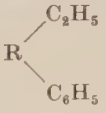
Amytal.



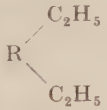
Nembutal.



Phenobarbital.



Barbital.



The accompanying chemical series is also the toxicity series. With the loss of the metals S and Na, with decrease in length of the carbon chain, with lessening in polarity of the molecule, toxicity diminishes.

In the case of the alcohols and the hydrocarbons toxicity is determined by the thermodynamic or isosteric[10] properties of the agents. Molecular weight, number of carbon atoms, fat solubility, boiling point, critical temperature, dielectric constant, activity coefficient, all correlate with toxicity. Certain physical-chemical properties of the compounds do not correlate, but enough do, so that we are put to it to decide which of the numerous properties are responsible for toxicity. Because one, say, fat solubility, is the most obvious, does not mean that it is the

property responsible for toxicity though it may be. Activity coefficients seem to me as especially likely causes of toxic effects.

But it is not only, nor primarily, the thermodynamic or isosteric properties of the toxic agents in which the protoplasmologist is interested, but rather, what happens to the protoplasm. In answer to this question work on anesthetic agents has been particularly revealing.

Anesthetic Agents.

Certain anesthetic agents such as carbon dioxide, cyclopropane, and nitrous oxide, are very effective in producing a cessation of protoplasmic flow in slime molds without noticeable injury, whereas others, such as ether, are highly damaging, and still others, such as ethylene which is known to have an anesthetic effect on man, has no harmful effect whatever on the protoplasm of a slime mold. In fact, ethylene appears to have a slight stimulating effect.

Of particular interest, and of importance in interpreting the physical change which has occurred, is the fact that the cessation of protoplasmic flow on the application of an anesthetic agent may be instantaneous.

On slime mold protoplasm carbon dioxide proved to be the most successful anesthetic agent[11]. About as good are cyclopropane and nitrous oxide. When any one of these gases is judiciously administered, the protoplasm ceases all visible movement without any noticeable injury, and recovers within a minute or two. Carbon dioxide proved to be ideal as an anesthetic agent for slime mold protoplasm. It acts quickly, causes little damage, and permits rapid recovery. The average time required to produce anesthesia of Myxomycetes, in the proportion of one part carbon dioxide to one part oxygen, is one minute, with recovery in about the same time. Three parts carbon dioxide to one part oxygen produce anesthesia in half a minute, with recovery, in two minutes.

Cold is also a very successful anesthetic agent for slime mold protoplasm. The use of cold as an anesthetic agent has a long historical background which culminates in the present day practice of human refrigeration at a temperature of 5° C.

Slime molds subjected to temperatures near the freezing point, both out of doors and in refrigeration rooms, becomes sluggish in movement at 5° C. A critical temperature is reached at 3° C below which streaming may stop at any moment and above which it never stops in a healthy specimen. Under 1° C, streaming stops within a minute. Below the freezing point no slime mold protoplasm continues to flow for more than a few seconds.

There is an interesting relationship between time of recovery, time of anesthesia, and injury as the following table shows.

Table I.

Temperature at anesthesia (degrees C)	6	4	3	2	1	0
Time for cessation of movement (in minutes)	28	8	4	3	2	1
Time for recovery (in minutes)	3	2	2	2	1.5	0.5
Pathological damage	great	little	none	none	none	none

The quicker the anesthesia, the quicker the recovery, and the less the injury.

Anesthesia by cold raises a time-honored question in biology, does protoplasm freeze at low temperatures? Surely the free water in a living cell freezes below 0° C. and the ice crystals thus formed disrupt the tissues, causing death. But plant protoplasm out of doors in the north survives at very low temperatures. To explain this it has been assumed that certain organisms rid themselves of all *free* water and retain only adsorbed or *bound* water through the winter. Bound water does not freeze, and it is sufficient to maintain life at the low metabolic rate of hibernating organisms, a tree or an insect pupa. When protoplasm cannot accomplish the change from free to bound water it succumbs. Ridding themselves of free water, possibly even converting some of the free water to bound water, is probably the basis of the winter hardiness of frost-resistant species. The cells of trees which would succumb at — 5° C can actually be made to withstand — 50° C by hardening.

Bound water is only a partial explanation of survival at low temperatures. Dissolved substances which lower the freezing temperature must also play a part, especially when the change is sudden as in the case of cold anesthesia. A slime mold subjected to a temperature of — 4° C ceases all movement in less than a minute, and recovers without injury. Survival at this temperature can only mean that there is no freezing of water; this may be due to the salt concentration of the protoplasm.

There is still another explanation of survival at low temperatures. Living matter may possess a mechanism for passing the critical point (temperature, pressure, volume) and thus escape freezing.

Heat.

The anesthesia of slime mold protoplasm may be brought on by heat. The margin between the temperature required for the cessation of protoplasmic movement and the temperature causing severe injury or death is much less than that in the case of cold but still sufficient to permit successful anesthesia in a primitive form of life. A typical case is the following: at 35° C streaming stops within an hour, and at 36° C within half an hour; at 38° C streaming may continue for several minutes

but at a reduced rate; at 39° C all flow in the smaller capillaries stops within three minutes but continues for four or five minutes in the larger capillaries; at 40°, or at 41 and 42° C in resistant specimens, flow stops in less than a minute; between 42 and 45° C death occurs if the time of exposure exceeds two minutes. Time of recovery varies, and is usually long in all cases of heat anesthesia, up to three-quarters of an hour being required. Here again recovery is related to time of exposure. Anesthesia by heat may be due to denaturation of the proteins, for the critical temperatures of the two processes are identical.

Shock.

Anesthesia by shock is very familiar to medical men. Emergency operations have been performed under such conditions. The shock may be mechanical or electrical. Mechanical shock may be administered to slime mold protoplasm simply by allowing a drop of water of known mass to fall from a known height on to protoplasm. The shock from the impact, if the height is sufficient, will produce a state of quiescence. The length of time that the protoplasm remains immobile is a measure of the degree of physiological shock. The height of the falling water drop when sufficient to cause a cessation of flow varies between 2.5 and 15 cm. The velocity V of a body falling from a height h, without initial velocity, may be expressed by the formula $V^2 = 2\,g\,h$, where g is the acceleration due to gravity or 980 cm sec^{-2}. Neglecting air resistance and assuming the mass of the water (36 milligrams) to be the same in successive experiments, the momentum, or mass x velocity, of the drop of water at the instant that it strikes the protoplasm can be ascertained.

A drop falling from a height of 15 cm will produce shock anesthesia for $1^1/_4$ minutes in thin peripheral protoplasm, whereas the thicker channels may be in a state of anesthesia for 4 minutes. One would rather expect the reverse to be true.

Shock anesthesia may be electrically produced without general injury, and most perfectly and consistently between a voltage of 30 to 50 and a milliamperage of 0.2 to 1.0. Cessation of protoplasmic flow is immediate and injury slight. A voltage above 60 is usually lethal.

Fact and Theory.

We come now to the question: what has happened to the protoplasm to bring about "suspended animation". The cessation of flow is at times exceedingly sudden. In every one of the foregoing cases of anesthesia, the protoplasm when dissected with micro-needles, was found to be a firm jelly. This was true no matter what the anesthetic agent; whether gas, fat solvent, change in temperature, or shock was applied the anesthetized protoplasm had gelated. Evidence of this is to be had in another way.

By means of an ingenious technique *Kamiya*[12] was able to oppose and to control protoplasmic streaming by applying pressure from without. Pressure thus applied will cause normal protoplasm to flow faster or, if opposed, to cease flow, but such external pressure does not move protoplasm when it is in a state of anesthesia. The protoplasm has gelated.

The theory that anesthetized protoplasm is in a gelated state was first advanced by *Claude Bernard*[13]. He unfortunately used the term "coagulation", and as coagulated protoplasm is usually regarded as dead protoplasm, the theory was discarded. Gelatinized protoplasm is however not dead protoplasm, but it is in a state of inactivation during which all metabolic activities, like physical activities, are reduced to a minimum.

I shall not here consider the several other theories of anesthesia which have been advanced, though a complete survey of anesthesia must include references to them, to changes in cell permeability, solubility of lipoids and fats whether concentrated at the cell surface or incorporated with the protein complex of the cell, and to the adsorption of the anesthetic agent by blood particles thus retarding oxidation by reducing the free adsorptive surface. I prefer simply to emphasize the gelatinized state of protoplasm here shown to exist in every form of anesthesia. Gelatinized protoplasm is inert protoplasm. In this state all physiological processes, movement, irritability, oxidative and enzymatic reactions, are held down to a minimum.

Stimulants.

The experimental work so far presented indicates that protoplasm gelates under the influence of an anesthetic agent whether that agent is a gas, a liquid solvent, cold, or a physical shock. It might be suspected, therefore, that stimulants have the contrary effect. The first proof of this came when protoplasm was treated with caffeine.

Caffeine has a remarkable liquefying effect on protoplasm. Within a few seconds after application the protoplasm gushes forth forming abnormal and rapidly enlarging pseudopodia. Theophylline and theobromine do the same[14]. To our surprise, morphine and heroin had a dispersing effect on protoplasm, similar to that of caffeine. The fluidity of the protoplasm is greatly increased, disruption of normal flow is rapid, and complete collapse follows, resulting in an outpouring of the protoplasm into large abnormal surface vesicles. The whole effect closely parallels that caused by the xanthine derivatives.

The action of morphine and heroin appeared to contradict our theory, illustrated in Fig. 1, that stimulants solate, and depressants gelate protoplasm. The seeming contradiction rested, however, on a misconception, namely, our belief that morphine is a depressant. In

a sense, and to a limited degree only, this is true, for morphine is described as analgesic, sedative, and a respiratory depressant. The same is said of heroin. As solation is the mark of a stimulant, we sought in medical literature for some substantiation of morphine as a stimulant. It was possible that the opiates function as does alcohol, first stimulation, then depression. The result of our search in the literature outdid our hope in regard to the possible stimulating effects of the opiates, for we read that "the phenanthrene alkaloids have both depressant and stimulating effects on the central nervous system"[15]. On reading further, it was soon obvious that the stimulating effects of morphine and heroin, as indicated by the solation of protoplasm, are more characteristic of these alkaloids than are their depressing effects. The action of morphine on muscle is one of stimulation, resulting in contraction. Convulsions are produced by codeine to an even greater extent than by morphine. The effect of heroin on the central nervous system is one of excitation. Heroin is taken by the addict for euphoric stimulation long after tolerance to the depressant effect has been established. Animals clearly show the excitatory effects of morphine. In some, "this alkaloid causes almost pure stimulation, convulsions, and death by exhaustion"; in certain species, morphine causes mania and tonic spasms which last many hours and often end fatally[15].

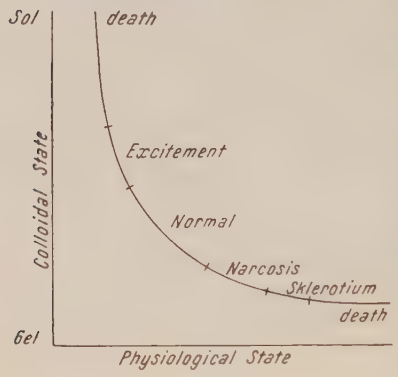


Fig. 1.

From these quotations it is evident that morphine and its chemical relatives are highly stimulating, depression being a less frequent and a secondary result. That morphine should liquefy protoplasm is, then, to be expected, and experimentation showed this to be true. The graph in Fig. 1 is, therefore, in full agreement with known normal and pathological behavior.

The graph presents 5 major regions which depict normal, pathological, and lethal states of protoplasm. Stimulation lies to one, and depression to the other side of the normal condition. The graph terminates with death by solation at one end and death by gelation at the other end. The central, normal region represents the great range in degree of fluidity through which active protoplasm may go. Obviously, the 5 regions grade imperceptibly into each other.

It is not my intention to extend the foregoing hypothesis further than the stimulation and depression of protoplasm caused by drugs,

but the idea may have wider applicability. This is indicated by the work of *Karrer*[16] who suggests that the electric stimulation of muscle may be correlated with the thixotropic behavior of gels, i.e., with thixotropic solation and thixotropic gelation. *Karrer*'s interpretation of muscular activity is supported by *Freundlich*[17] who made much of thixotropy in biological reactions.

There is one feature of drug action which must constantly be borne in mind; it is well illustrated in the response of organisms to alcohol and ether. Many substances first stimulate and then depress, or they are stimulants in mild doses and depressants in heavy doses.

Interpretations of Structure.

Protoplasm, in passing from one degree of fluidity to another coincident with changes in physiological state, must inevitably undergo changes in the degree of aggregation of its molecular or colloidal units. The primary structural units of protoplasm are fibrous protein molecules, or molecular aggregates of these, oriented and interlocked in such a way as to give to the active living substance both the elasticity and the fluidity of a soft jelly[18, 19]. The physical state of the various degrees of colloidal aggregation, and the kinds of bonds existing between the structural units, are problems of as much significance to the study of protoplasm as they are to the study of elastic proteins, rubber, and polymers in general.

Numerous hypotheses of aggregation have been advanced in explanation of the solation and gelation of colloidal jellies. The interlocking of protein fibers is the basic mechanism of most of them. The micelles of *Naegeli* give no hint of structural continuity. The parallel alignment of molecular chains into grids, postulated by *Astbury*[20], makes for rigidity but not fluidity. *Bungenburg de Jong*[21] introduced the coacervate concept, which he thought best illustrates the physical state of many colloidal jellies, of muscle, and of protoplasm. The chief virtue of a coacervate as a model of living matter is the delicate balance existing between the forces of solvation and those of dehydration. But there is another feature of the living and of non-living jellies which more truly represents the structural basis of sol-gel transformation: it is the continuity in structure which gives to protoplasm and to non-living jellies the fluidity of a sol and the elastic rigidity of a soft gel, at one and the same time.

The colloid chemist may see in a coacervate the molecular mechanism which permits sol-gel transformation, and the protein chemist may regard denaturation as responsible for the change. In the latter case, the solation of protoplasm may be due to a loosening or a destruction of the lateral bonds of proteins, or to a complete cleavage of the protein

chains, or, less likely, a curling or folding of molecular fibers, all of which mechanisms will partially or fully set free previously interlocked molecules. Increase in the viscosity of protein solutions is used as a criterion of denaturation. Without denying coacervation and protein denaturation as mechanisms involved in changes in protein fluidity, I believe that a better picture of what is happening in the sol-gel transformations of protoplasm is to be had from present-day concepts of loose, shifting, and fluid bonds.

Fibrous molecules, feebly interlocked by side chains with mobile bonds, permit flow in a semirigid structure. The nature of these intermolecular ties is the subject of much present-day colloidal literature, from the hydrogen bond discussed in full by *Pauling*[1] to the fluid joint postulated for rubber[22]. It is these labile unions between linear molecules which make possible the pronounced, and often rapid, changes in the physical state of protoplasm, the sol-gel transformations which accompany stimulation and narcosis.

Whatever the precise mechanism of the sol-gel transformation in protoplasm may be, the experimental facts are clear, that there is a correlation between pathological change and the physical state of protoplasm, that aggregated protoplasm is characteristic of the depressed state, and dispersed protoplasm of the stimulated state. Anesthetic agents which suppress activity, gelate protoplasm; drugs such as morphine, heroin, and the xanthine derivatives which cause stimulation, disperse protoplasm. This deduction is to be expected, for chemical reactions and, therefore, physiological activities are certain to occur at a lower rate in a gel than in a sol. This fact is well illustrated in the comparatively dry protoplasm of a resting seed, and even better in the sclerotium of the organism on which the present research rests. This sclerotium is the resting or hibernating protoplasm of a slime mold. It is an xerogel and represents as dry and hard a form of living protoplasm as is known anywhere in nature.

We may therefore conclude that protoplasm undergoes pronounced changes in fluidity during its normal activity. The normal range is increased by pathological conditions. Stimulants solate the living substance. Narcotics, anesthetic agents, and depressants gelate protoplasm. Toxic salts usually coagulate protoplasm, but may, when their effect is a stimulating one, solate protoplasm.

Such a conclusion is in keeping with a rational interpretation. With stimulation, or increased "nervous" activity, a dispersal or loosening of the protein units in protoplasm is to be expected, whereas narcosis or suppressed activity involves an aggregation or tightening of the intermeshing linear molecules of protoplasm. Excessive loosening or tightening of the fibrous structural units results in death.

What objections may be raised to this interpretation of protoplasmic behavior will be based primarily on the question, what constitutes activation or stimulation, and what is depression or narcosis? Objections cannot be based on experimental grounds for the conclusions here presented rest on experimental findings which are verified physically and optically.

Summary.

A rheologist would express the fundamental physical properties of protoplasm in the following terms: the living substance is elastic, non-Newtonian, and possesses a measurable rigidity and tensile strength; these properties all owe their existence to continuity in the structure of protoplasm.

The structural elements of protoplasm are molecular protein fibers which are loosely bound together. The fibers are assembled in one of several ways, an intertwining brush-heap, a symmetrical grid, oriented micellae, or a parallel overlapping alignment. In each case there is contact between the fibers. The firmness of these contact bonds determines the magnitude of the foregoing physical properties, and also the physiological state of protoplasm.

When substances which cause physiological depression are added to protoplasm, substances such as narcotic or anesthetic agents, no matter what their nature, whether carbon dioxide, chloroform, cyclopropane, cold, electrical or mechanical shock, the protoplasm gelates, it is converted into a firm jelly. Gelatinization has taken place because the bonds between the fibrous structural units have tightened. If the bonds become irreversible, then coagulation, and death, result.

When, on the other hand, substances which cause physiological stimulation, substances such as caffeine, theobromine, or morphine, are added to protoplasm, the living substance solates, it becomes more fluid because the bonds between the protein fibers have loosened. The protoplasm is in a more excitable state. If the bonds become wholly free, then a complete, irreversible, collapse in structure, and death, result.

Zusammenfassung.

Die grundlegenden physikalischen Eigenschaften des Protoplasmas hinsichtlich seines Aggregatzustandes können in folgender Weise schlagwortartig wiedergegeben werden: Die lebende Substanz ist elastisch nicht-newtonisch und besitzt meßbare Unbiegsamkeit und innere Spannung. All diese Eigenschaften haben ihre Ursache in der Kontinuität der Struktur des Protoplasmas.

Die Strukturelemente des Protoplasmas sind molekulare Eiweißfasern, die lose miteinander verbunden sind. Der Zusammenhang dieser Fasern ist auf verschiedene Art und Weise gegeben: in Form verflochtener Haufen von Bündeln, von symmetrischen Gittern, orientierten Mizellen oder parallelen, sich überdeckenden Anordnungen. In jedem Fall besteht zwischen den einzelnen Fasern Kontakt, dessen Innigkeit sowohl für die Ausgeprägtheit

der physikalischen Eigenschaften als auch für den physiologischen Zustand des Protoplasmas bestimmend ist.

Wenn Substanzen von narkotischer oder anästhesierender Wirkung, die eine Herabsetzung der physiologischen Erregbarkeit zur Folge haben, dem Protoplasma zugesetzt werden — wobei die Art dieser Substanzen oder Einflüsse gleichgültig ist (entweder Kohlendioxyd, Chloroform, Cyclopropan, Kälte, elektrischer oder mechanischer Schock) —, geliert das Protoplasma, es geht in gallertigen Zustand über. Diese Zustandsänderung hat ihre Ursache in der Verfestigung der Bindungen zwischen den strukturellen Fasereinheiten. Werden diese Bindungen irreversibel, so tritt Koagulation und Tod ein.

Wenn anderseits Stimulantia, z. B. Coffein, Theobromin oder Morphin, dem Protoplasma zugeführt werden, so nähert sich die lebende Substanz dem Solzustand, sie wird flüssiger, da die Bindungen zwischen den Eiweißfasern gelockert werden. Das Protoplasma gerät in einen Zustand der Erregbarkeit. Werden diese Bindungen gänzlich gelöst, so erfolgt ein völliger irreversibler Zusammenbruch des strukturellen Aufbaus, es tritt der Tod ein.

Résumé.

Un rhéologue exprimerait les propriétés physiques fondamentales du protoplasma dans les termes suivants: la substance vivante est élastique, non-newtonnienne et possède une rigidité mesurable et une résistance à la traction; ces propriétés doivent toutes leur existence à la continuité dans la structure du protoplasme.

Les éléments structuraux du protoplasme sont des fibres de molécules de protéines qui sont liées d'une manière lâche. Les fibres sont assemblées d'une ou plusieurs manières: un amas de poils enchevêtrés, une grille symétrique, des micelles orientées ou un alignement parallèle enveloppant. Dans chaque cas, il y a contact entre les fibres. La solidité de ces liaisons de contact détermine l'ampleur des propriétés physiques ci-dessus et aussi l'état physiologique du protoplasme. Quand on ajoute à celui-ci des substances qui produisent une dépression physiologique, des substances comme les agents narcotiques ou anesthésiques, sans aucun égard sur leur nature, gaz carbonique, chloroforme, cyclopropane, le froid, le choc électrique ou mécanique, le protoplasme se gélifie; il se transforme en un gel solide. La gélatinisation a eu lieu parce que les liaisons entre les unités fibreuses structurales se sont resserrées; si les liaisons deviennent irréversibles, il en résulte alors la coagulation et la mort.

Quand, d'un autre côté, les substances qui produisent la stimulation physiologique, substances comme la caféine, la théobromine ou la morphine, sont ajoutées au protoplasme, la matière vivante passe à l'état de sol; elle devient fluide parce que les liaisons entre les fibres protéiques se sont relâchée. Le protoplasme est dans un état plus excitable. Si les liaisons deviennent entièrement libres, il en résulte alors un effondrement complet, irréversible de structure, et, la mort.

Literature.

[1] *L. Pauling*, The Nature of the Chemical Bond, Ithaca, N. Y., 1945.
[2] *H. S. Harned* and *B. B. Owen*, The Physical Chemistry of Electrolytic Solutions, New York, 1943.
[3] *D. R. Briggs*, J. Physical Chem. **32**, 1646 (1928).
[4] *I. Langmuir*, J. Amer. Chem. Soc. **41**, 1543 (1919).
[5] *W. Seifriz*, Science **110**, 1 (1949).

[6] *F. Feigl*, Specific and Special Reactions, New York, 1940.
[7] *W. Seifriz* and *H. Pollack*, Protoplasma **39**, 55 (1949).
[8] *W. Seifriz* and *H. Pollack*, Arch. Science **2**, 9 (1949).
[9] *W. Seifriz* (in press).
[10] *W. Seifriz*, Science **107**, 15 (1948).
[11] *W. Seifriz*, Anesthesiology **2**, 300 (1941).
[12] *N. Kamiya*, Science **92**, 462 (1940).
[13] *Claude Bernard*, Leçons sur les anesthesiques et sur l'asphyxie, Paris, 1875.
[14] *W. Seifriz* and *H. L. Pollack*, J. Coll. Sci. **4**, 19 (1949).
[15] *L. Goodman* and *A. Gilman*, The Pharmacological Basis of Therapeutics, New York, 1941.
[16] *E. Karrer*, J. Rheology **3**, 334 (1932).
[17] *H. Freundlich*, The Structure of Protoplasm, a monograph, ed. by *William Seifriz*, p. 85, Ames, Iowa, 1942.
[18] *A. Frey-Wyssling*, Submicroscopic Morphology of Protoplasm, New York, 1948.
[19] *W. Seifriz*, The Structure of Protoplasm, Ames, Iowa, 1942.
[20] *W. T. Astbury*, in Essays on Growth and Form, ed. by *E. Clark* and *P. B. Medawar*, p. 309, Oxford, 1945.
[21] *H. G. Bungenburg de Jong*, La coacervation, les coacervats, et leur importance en biologie, Vols. 1 and 2, Paris, 1936.
[22] *L. R. G. Treloar*, Rep. Progr. Physics **9**, 113 (1943).

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien.

Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen am lebenden Chloroplasten.

Von

Josef Gicklhorn.

(Eingelangt am 20. September 1950.)

Ausgangspunkt der Beobachtungen waren Versuche über postmortale Farbstoffbildung in grünen Laubblättern, wozu bereits eine Anzahl einfacher und einprägsamer Versuche von *H. Molisch*[1], *O. Werner*[2], *J. Gicklhorn*[3] u. a. beschrieben wurde. Bisher scheint aber noch niemand den Verlauf dieser Farbstoffbildung statt in gewöhnlichem Tageslicht auch in filtriertem ultraviolettem Licht verfolgt zu haben, obwohl ein aufschlußreiches Ergebnis auf jeden Fall zu erwarten ist; denn entweder haben diese vor den Augen des Beobachters auftretenden Farbstoffe eine Eigenfluoreszenz oder, falls sie nicht selbst in irgendeinem Farbton fluoreszieren, müssen sie die stets vorhandene Rotfluoreszenz der Chloroplasten im lebenden Laubblatt verändern oder löschen. Die Farbstoffbildung selbst ist sehr leicht und sicher auszulösen, wenn man lokalisiert, z. B. einen heißen Glas- oder Metallstab auf ein lebendes Laubblatt aufsetzt und damit enge begrenzt eine tödliche Verletzung setzt. Es zeigt sich dann, daß die unmittelbar geschädigte Stelle ungefärbt bleibt und sich mit durchscheinend dunkelgrüner Farbe abhebt, was durch Infiltration der Zwischenzellräume mit ausgetretenem Zellsaft bedingt ist, der die Luft zwischen den Interzellularen verdrängt. Die unmittelbar an die sofort tödlich geschädigten Partien angrenzende Zone, in welcher eine Schädigung nicht schlagartig, sondern allmählich erfolgt, verfärbt sich vor den Augen des Beobachters schon nach wenigen Sekunden oder Minuten zunehmend stärker nach einem braunen, manchmal tief schwarzen Farbton. Diese Zone geht dann mehr oder minder scharf getrennt in das sicher ungeschädigte Blattgewebe mit unverändert grüner Farbe über. Geeignete Versuchsobjekte für diese ebenso einfachen als eindrucksvollen Beobachtungen sind namentlich Laubblätter der Forsythia, des Efeu, der Birne, Pappel, Linde, Weide u. a.

Die Erklärung der Erscheinung ist bereits von *Molisch* gegeben worden. In der unbekannt großen Vielfalt chemischer Verbindungen im Zellsaft und Protoplasma pflanzlicher Zellen und Gewebe gibt es allgemein verbreitet Verbindungen, „Chromogene", die unter dem Einfluß von Enzymen (Oxydasen) gefärbte Reaktionsprodukte liefern. Solange das lebende Blatt unversehrt ist, sind Chromogene und Enzyme räumlich getrennt; sobald aber durch Zerstörung der Struktur des lebenden Protoplasmas die beiden Stoffgruppen miteinander in Berührung kommen können, setzen ungehemmt die chemischen Reaktionen ein. Das Entstehen und die auffallende Lokalisierung der postmortal oder während des Absterbens der Zellen gebildeten Farbstoffe in einem lebenden grünen Laubblatt sind also dahin zu erklären, daß an der unmittelbar durch Hitze geschädigten Gewebspartie die temperaturempfindlichen Enzyme vernichtet oder inaktiviert werden, daher trotz vorhandener Chromogene (es sind wohl meist Stoffe mit phenolartigen Bindungen) eine Pigmentbildung nicht erfolgen kann, ebenso wie in den vollkommen ungeschädigten Blattpartien. In jenen Stellen aber, in denen die Schädigung, verbunden mit einer mehr oder minder tiefgreifenden Strukturänderung im Feinbau des lebenden Protoplasmas, langsam einsetzt, erfolgt auch das Zusammentreffen der beiden Komponenten langsam und daher der Ablauf einer chemischen Reaktion in meßbar langsamer Zeit. Einzelheiten über Beobachtungen, welche diesen Grundversuch bezüglich Pflanzenspezies, verschiedenen Organen, verschiedenen Entwicklungsstadien, verschiedenem anatomischen Bau der Laubblätter u. a. variieren, sind hier belanglos.

In engerem Zusammenhang mit den eigenen Beobachtungen steht jene interessante Erscheinung, die erstmalig *Kautsky*[4] beschrieben hat. Bedeckt man ein lebendes Laubblatt mit einem lichtundurchlässigen schwarzen Papier und bringt es unter eine kräftge UV-Lichtquelle mit dem üblichen UV-Filter, dann beginnt nicht — wie man erwarten könnte — die Rotfluoreszenz des Chlorophylls augenblicklich nach dem Wegziehen des Papiers. Erst nach 2 bis 5 Sek. — je nach der Intensität des UV-Lichtes — setzt in steigender Intensität die Rotfluoreszenz des lebenden Laubblattes ein, erreicht einen Höhepunkt und geht dann allmählich bis zu einer fallweise bestimmten Intensität zurück. *Kautsky* hat dieses überraschende Phänomen im Sinne der Photochemie als eine Art „Induktionseffekt" gedeutet, ohne weitere Möglichkeiten der Erklärung zu berücksichtigen. Bezeichnend scheint mir in seiner Arbeit aber der ausdrückliche Hinweis, daß diese wechselnde Fluoreszenzstärke um so klarer hervortritt, je näher das Blatt der Lichtquelle (einer Quarzglasquecksilberdampflampe) gebracht wird. Jede solche Annäherung bedeutet aber — ohne besondere Vorsichtsmaßregel — nicht nur eine Intensitätssteigerung des UV-*Lichtes*, sondern unver-

meidlich auch eine sprunghafte *Erwärmung* des lebenden Laubblattes im Vergleich zu Temperaturen in größerer Entfernung von der Lichtquelle.

Wenn man nun im verdunkelten Raum ein grünes, lebendes Laubblatt — solche des Tabaks noch nicht blühender Pflanzen sind besonders geeignet — zwecks Herstellung eines Präparates mit postmortaler Farbstoffbildung zunächst bei einer konstanten Rotfluoreszenz im UV-Licht kurze Zeit beläßt, und dann einen erhitzten Gegenstand (Glas- oder Metallstab, glimmendes und aschefreies Ende einer brennenden Zigarette) auf das Blatt aufsetzen will, so erfolgt meist schon bei bloßer Annäherung des heißen Gegenstandes eine auffallende *Verstärkung der schon vorhandenen Rotfluoreszenz* des lebenden Blattes, viel weiter als nachweisbar die Farbstoffbildung erfolgt. Wird der erhitzte Gegenstand entfernt, so geht die Fluoreszenzintensität wieder auf die ursprüngliche Stärke zurück. Nach kurzem Warten kann man die gleiche Erscheinung einige Male wiederholen. *Dieser einfache Versuch zeigt also eine reversible Fluoreszenzsteigerung des Chlorophylls im lebenden Laubblatt unter dem Einfluß sprunghafter Temperaturerhöhung.* Bemerkenswert scheint dazu, daß alkoholische Lösungen von Chlorophyll oder dessen Lösungen in Benzol oder in Lipoiden diese ausgiebige Fluoreszenzsteigerung unter gleichen Versuchsbedingungen nicht zeigen. Damit ist schon ein Hinweis gegeben, daß Veränderungen in *lebenden* Chloroplasten maßgeblich beteiligt sind. Zwangsläufig erhebt sich für den Biologen daher die Frage nach einem eindeutigen *Vitalitätsnachweis* der Chloroplasten (= Chlorophyllkörner). Dieser Nachweis ist leicht zu erbringen. Wird ein lebendes Laubblatt durch mehrtägige Verdunkelung — am besten der ganzen Versuchspflanze — stärkefrei gemacht und dann an einzelnen Blättern bei schwächstem Lichte im Dunkelzimmer der früher beschriebene Versuch zur Herstellung lokal begrenzter Farbstoffbildung ausgeführt, dann ist zu erwarten, daß eine ungestörte CO_2-Assimilation unter Bildung autochthoner Stärke im Chloroplasten nur dann eintritt, wenn dieser vollkommen ungeschädigt ist. Im gegenteiligen Fall findet keine Stärkespeicherung, bzw. Stärkebildung im Chlorophyllkorn statt, was ja leicht makroskopisch am ganzen Blatt und mikroskopisch an jedem einzelnen Chloroplasten durch Anwendung der Jodprobe festzustellen ist. Das Versuchsergebnis zeigte, daß jede geschädigte Stelle des Laubblattes nach ganztägiger Exposition im direkten Sonnenlicht tatsächlich frei von Stärke blieb. Alle jene Partien aber, die nach kurzfristigem Einfluß erhöhter Temperatur durch strahlende Wärme in weitem Umkreis eine lebhafte Fluoreszenzsteigerung aufwiesen, zeigten eine positive Jodprobe. Mit diesen Beobachtungen ist also der geforderte Nachweis geliefert, daß *die reversible Intensitätssteigerung der Rotfluoreszenz*

von Chloroplasten im Laubblatt nicht mit einer irreversiblen Schädigung verbunden ist bzw. verbunden sein muß.

In Ergänzung zu diesen einfachen, noch immer makroskopischen Grundversuchen kam es nun weiter darauf an, dasselbe Phänomen *an isolierten Chloroplasten* nachzuweisen. Als besonders geeignet fand ich die relativ großen Chloroplasten von *Potamogeton-* (Laichkraut-) Arten und *Myriophyllum-* (Tausendblatt-) Arten, die in der Weise gewonnen wurden, daß mit einem Bündel übereinandergelegter scharfer Rasierklingen, die durch eine Klammer fest zusammengehalten waren, die Blätter auf Glasplatten in Schnitte zerlegt wurden und die aus den angeschnittenen Zellen austretenden Chloroplasten in einer vorher empirisch als isotonisch ermittelten Lösung von Milchzucker und Glycerin gesammelt wurden. Durch Zentrifugieren konnten die groben Gewebsanteile und ganze Protoplasten mit ihrem Inhalt gesondert werden, so daß bei mehrmaligem Wiederholen des Zentrifugierens bei geeigneter Tourenzahl schließlich eine ausreichende Masse isolierter, lebender, nahezu vollkommen protoplasmafreier Chloroplasten gewonnen werden konnte. Mit diesen isolierten Chloroplasten läßt sich ein mikroskopisches Präparat herstellen, das mit freiem Auge betrachtet, eine homogen grüne Schicht bildet. An solchen Präparaten tritt die reversible Intensitätssteigerung der Rotfluoreszenz des Chlorophylls durch Temperaturerhöhung noch eindrucksvoller hervor, und vor allem läßt sich zeigen, *daß diese Fluoreszenzsteigerung bei Temperaturen eintreten kann, die sicher unter der Schädigungsgrenze liegen.* Die Beobachtung solcher Präparate im großen *Reichert*schen Fluoreszenzmikroskop zeigte weiters, daß die mikroskopisch sichtbaren Grana der Chloroplasten besonders intensiv leuchten, daß aber auch die dazwischenliegenden Chloroplastenpartien bei sprunghafter Temperatursteigerung kräftig fluoreszieren. Es hängt nun wesentlich von der *Geschwindigkeit und Dauer* der Erwärmung ab, ob es im lebenden Chloroplasten zu einer Bildung mikroskopisch kaum sichtbarer Grana *neben den bereits vorhandenen* kommt oder nicht, wobei offensichtlich „Entmischungsvorgänge" beteiligt sind.

Zwangsläufig führen also diese Beobachtungen zu den noch immer kritischen Fragen über die Feinstruktur des Chloroplasten, dem Lösungszustand des nativen Chlorophylls — ob molekulardispers oder kolloid gelöst — und zur Frage nach den chemischen Bestandteilen des Chloroplasten. Dazu sei nur kurz daran erinnert, daß man sich heute den Feinbau von Chloroplasten ungefähr so vorstellt: eine distinkte Membran (Peristromium) die wesentlich aus Eiweiß besteht, umschließt die Grundmasse des Chloroplasten, dessen Feinstruktur aus Schichten (Lamellen) gebildet wird, in denen Grana aus Lipoidstoffen eingelagert sind, die den größten Teil des Chlorophylls enthalten. Die übrige Grundmasse ist ein Gemisch aus Lipoproteiden, wahrscheinlich in einem

labilen Gelzustand mit submikroskopischer Feinstruktur. Zu einzelnen Fragen über den Chloroplastenbau verweise ich hier bloß auf die Studien von *Frey-Wyssling* und *Mühlethaler*[5], die den Feinbau der Chlorophyllkörner im Elektronenmikroskop (Schweizer Modell) untersuchten, und unter ihren Objekten auch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Chloroplasten des Tabaks vorlegen, der sich in meinen Beobachtungen als ein ebenfalls besonders günstiges Demonstrationsobjekt erwies. Die Autoren gehen auf die Problematik des Feinbaues und der chemischen Zusammensetzung ausführlicher ein, wobei sie eine Meinung zur Diskussion vorlegen, die folgendermaßen formuliert wird:

„Es scheint unwahrscheinlich und mengenmäßig unmöglich, daß der gesamte Lipoidgehalt in den Granen enthalten ist. Aus Abb. 3 ist zu erkennen, wie eine solche Myelinscheibe als breiter Schlauch aus der Stromasubstanz herauswächst. Man darf daher annehmen, *daß Lipoide sowohl in den Granen, als auch im Stroma vorkommen.* Ihr Zustand müßte jedoch in den beiden Chloroplastenbestandteilen verschieden sein ... Die Bindung der Lipoidmoleküle an die globulären Eiweißmakromoleküle muß allerdings *nur schwach* sein, da es leicht gelingt, sie als Myelin aus den Plastiden auswandern zu lassen (*Weber, Menke* 1934). Dabei werden zwar auch die Granalipoide und mit ihnen der Chlorophyllfarbstoff in Mitleidenschaft gezogen ... Wir schließen ..., daß die Granen aus abwechselnden Eiweiß- und Lipoidlamellen bestehen, wobei die Lipoidmoleküle senkrecht zu den Proteinschichten gerichtet sind, wie dies früher auf Grund polarisationsoptischer Untersuchungen postuliert worden ist ..." (S. 182/183).

Diese Deutung elektronenmikroskopischer Bilder erscheint mir auch die einfachste und nächstliegende Erklärung für die hier beschriebenen Beobachtungen zu sein. Nach diesen einfachen Beobachtungen wären auch kritische Bemerkungen zu den bisherigen Studien über Chloroplastenfluoreszenz, Feinstruktur des Chloroplasten und Lösungszustand des nativen Chlorophylls am Platze, doch soll hier nicht weiter darauf eingegangen werden. Besonders beachtenswert scheint mir die Übereinstimmung elektronenmikroskopischer Strukturbilder des Chloroplasten mit dem Versuch, die reversible Fluoreszenzsteigerung als einen *Entmischungsvorgang* zu deuten. Die hier beschriebenen Versuche sind nur wesentlich einfacher, bequemer und billiger als elektronenoptische Untersuchungen.

Zusammenfassung.

Unter dem Einfluß einer sprunghaften Temperatursteigerung kann es zu einer reversiblen Entmischung auch locker gebundener Lipoide im Strukturgefüge eines Chloroplasten kommen, wobei natives Chlorophyll in den noch submikroskopischen Grana gespeichert wird. Dieser Vorgang verrät sich durch eine auffallende Intensitätssteigerung der

Rotfluoreszenz des ganzen Chloroplasten und es hängt nur von der Art der Behandlung ab, ob diese Entmischung vorübergehend oder dauernd ist. Es scheint aber besonders bemerkenswert, daß man an lebenden Chloroplasten mikroskopisch keinerlei Veränderungen merkt, auch nicht bei Beobachtung im Ultramikroskop, so daß diese reversible Fluoreszenzsteigerung zu den einfachsten Möglichkeiten gehört, eine submikroskopische Veränderung sinnfällig zu machen. Dazu sei weiters bemerkt, daß diese Strukturänderung sich offensichtlich im Bereich der Vitalitätsgrenzen abspielt und eine bleibende Strukturänderung durch irreversible Schädigungen auch im Fluoreszenzmikroskop auffallend war.

Summary.

A reversible dissociation of even loosely bound lipoids in the structural parts of a chlorplast, whereby native chlorphyll may be stored in the still submicroscopic grana, may be brought about by a sudden increase in temperature. This process reveals itself through a striking rise in the intensity of the red fluorescence of the entire chloroplast, and the type of treatment alone determines whether this dissociation is temporary or permanent. However, it should be particularly noted that no changes of any kind can be observed microscopically in living chloroplasts, or even under the ultramicroscope, so that this reversible increase in fluorescence belongs to the simplest possibilities of making a submicroscopic alteration evident. It should also be noted that this structural change obviously takes place in the region of the vitality limits and permanent structural change due to irreversible damages becomes evident also in the fluorescence microscope.

Résumé.

De même que chez des lipoïdes associés par liaison faible, on peut arriver, sous l'influence d'une élévation brusque de température, à une démixtion réversible chez un assemblage structural d'un chloroplaste pour lequel la chlorophylle naturelle est encore emprisonnée dans des granules submicroscopiques. Ce processus se traduit par une élévation frappante de l'intensité de la fluorescence rouge du chloroplaste entier et il ne dépend que du mode de traitement, que cette démixtion soit passagère ou permanente. Il paraît alors particulièrement digne de remarque que l'on ne puisse microscopiquement observer aucune altération chez le chloroplaste vivant, non plus que par observation à l'ultramicroscope, de sorte que cette élévation réversible de la fluorescence appartient à une altération submicroscopique, comme supposition la plus simple. On doit remarquer, d'ailleurs que cette altération de structure se manifeste évidemment dans le domaine des limites de vitalité et qu'une altération permanente de structure soit frappante aussi au microscope à fluorescence à la suite de lésion irréversible.

Literatur.

[1] *H. Molisch*, Botanische Versuche ohne Apparate, Fischer, Jena 1931.
[2] *O. Werner*, Österr. bot. Z. **77**, 38 (1928).
[3] *J. Gicklhorn*, Österr. bot. Z. **94**, 136 (1947).
[4] *H. Kautsky*, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1762 (1932).
[5] *A. Frey-Wyssling* und *K. Mühlethaler*, Vierteljahrsschr. naturforsch. Ges. Zürich, **94** (1949). Daselbst weitere Literatur über Feinbau der Chloroplasten.

Botanisches Institut der Hochschule für Bodenkultur in Wien und Fachausschuß „Holzbiologie" der Österr. Ges. f. Holzforschung.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an verholzten Zellwänden.

Von

J. Kisser und **W. Wittmann.**

(Eingelangt am 19. Juli 1950.)

Einleitung.

Die Holzforschung ist im besonderen Maße an den einfachen Nachweismöglichkeiten des Verholzungsgrades der Holzelemente interessiert, da durch diesen im Verein mit der anatomischen Struktur die technischen Eigenschaften der Hölzer bestimmt werden. Die gebräuchlichen Holzreaktionen mit aromatischen Aminen, Phenolen und Naphtholen sind jedoch zur Feststellung des Verholzungsgrades nicht geeignet. Dagegen lassen sich mit Hilfe der Chlorzinkjod-Reaktion und besonders durch gewisse Färbungen sehr wertvolle Einblicke in den Verholzungsgrad sowie in die Gefügedichte verholzter Elemente gewinnen. (*Kisser* und *Sturm*[1]). Da nun der verholzten Zellwand auch eine gewisse Primärfluoreszenz zugeschrieben wird, so war es für uns wichtig zu untersuchen, ob diese Leuchtreaktion vielleicht ebenfalls Aufschluß über den Verholzungsgrad zu geben vermag. Nun stellt aber die verholzte Zellmembran ein sehr komplexes Gebilde dar, das nicht nur aus chemisch sehr verschieden gebauten Substanzen besteht (Hemizellulosen, Zellulose und Lignin, wozu noch Sekundäreinlagerungen von Harzen, Gerbstoffen, Farbstoffen u. dgl. kommen), sondern auch eine ganz bestimmte submikroskopische Struktur besitzt (Micellartextur der Zellulose, Abdeckung der Micelle durch Lignin, daneben Hemizellulosen in den submikroskopischen Räumen), wobei Struktur und Chemismus der einzelnen Wandschichten wieder verschieden sind.

Solange wir nichts Näheres darüber wissen, was eigentlich in der verholzten Zellwand die Blaufluoreszenz bedingt, ob das Vorhandensein bestimmter Verbindungen mit bestimmten Atomgruppen (Fluoro-

phore) oder ob gewisse Membranstoffe erst durch die Art ihres Zustandes oder ihre besondere Verteilung oder ihre Vermischung mit anderen Stoffen lumineszenzfähig werden (vgl. *Przibram*[2]), ist es auch nicht möglich, darüber etwas auszusagen, ob es sich bei der Primärfluoreszenz um ein Spezifikum und damit um eine eindeutige Nachweismöglichkeit der verholzten Membran an sich handelt oder ob sie nur einem einzelnen Membranbaustein oder einem bestimmten Strukturzustand zuzuschreiben ist. Mit dieser Frage mußten wir uns daher zunächst näher auseinandersetzen.

Die bisherigen Angaben über Primärfluoreszenz der verholzten Zellwand wie der Zellwände überhaupt sind vielfach widersprechend und vermögen daher diese Frage nicht zu klären. *Hartmann* (zit. nach *Lehmann*[3]) schreibt den zellulosischen Membranen eine charakteristische weiße Fluoreszenz zu, die bald nach Blau, bald nach Gelb spielt; *Klemm*[4] und *Metzner*[5] sprechen von einem höchstens schwach graublauen Farbton, nach *Göthel*[6] ist ihre Fluoreszenzfarbe bläulichweiß, nach *Eichler*[7] dagegen sind sie farblos. Für Pektinstoffe gibt *Göthel* eine gelbliche bis bräunliche Fluoreszenzfarbe an.

Für verholzte Membranen finden wir folgende Angaben von Fluoreszenzfarben: grünlichblau bis blau (*Klein* und *Linser*[8]), blau bis bläulichgrün (*Metzner*[5]), blau (*Vodrazka*[9]) und leuchtend weißgelblich (*Göthel*[6]). Blaue Fluoreszenz gibt auch *Eichler*[7] an und schreibt sie dem Lignin zu, da bei Kiefern- und Buchenholz das nach Auflösen der Zellulose mit Fluorwasserstoffsäure zurückbleibende Lignin blau fluoresziert. In jüngster Zeit hat sich dann *Wimmer*[10] mit der Primärfluoreszenz verholzter Wände näher beschäftigt; auch er gibt blau als Fluoreszenzfarbe an und versuchte gleichzeitig, durch mikrofluoroskopische Untersuchungen den Verholzungsvorgang näher zu verfolgen, wobei er durch den Vergleich mit der Phloroglucin-HCl-Reaktion feststellte, daß die fluoroskopische Leuchtreaktion allen anderen Reaktionen überlegen ist und durch sie die Verholzung bereits in einem Stadium angezeigt wird, in welchem die Phloroglucin-HCl-Reaktion noch negativ ausfällt. Die von *v. Wacek*[11] zur Klärung der Frage nach der Fluoreszenz von Lignin zur Verfügung gestellten und von *Wimmer*[10] näher untersuchten Ligninbausteine bzw. Modellsubstanzen gaben jedoch kein einheitliches Bild und zeigten Fluoreszenzfarben von grau, grünlich, grellgrün, himmelblau und blau.

Schließlich untersuchten *Kirmreuther*, *Schlumberger* und *Nippe*[12] das Fluoreszenzverhalten verholzter Membranen beim Sulfit-Abbau und führen die violette Fluoreszenzfarbe auf die Ligninsulfosäuren zurück, dagegen erklärt sie *Leupold*[13] aus dem Vorhandensein von Schwefel. *Gerngrosz* und *Tsou*[14] sprachen sich anfangs gegen beide Ansichten aus und machten für die Fluoreszenzfarbe einen Naturfarbstoff ähnlich dem Fisetin verantwortlich, doch sieht ersterer in der Folge (*Gerngrosz*[15]) ebenfalls die Ligninsulfosäuren als Ursache an.

Für die nachstehenden Untersuchungen wurde eine Fluoreszenzeinrichtung der Optischen Werke C. Reichert, Wien, in Verbindung mit dem Universal-Kamera-Mikroskop der gleichen Firma benutzt. Das verwendete Schwarzglasfilter hatte eine Durchlässigkeit zwischen 4000 und 2000 Å mit dem günstigsten Bereich zwischen 3800 und

3000 Å und dem höchsten Punkt bei 3500 Å. Das Okularsperrfilter trug die Bezeichnung 9,5. Als Lichtquelle diente eine Hanauer Quecksilberdampflampe S 100. Präparation und Untersuchung des Materials erfolgten unter den üblichen Kautelen, um sekundäre Fluoreszenzerscheinungen auszuschließen. Ebenso wurden alle Untersuchungsflüssigkeiten, Extraktionsmittel usw. stets auf ihr Fluoreszenzverhalten geprüft und unter entsprechenden Bedingungen verwendet und aufbewahrt.

Die Primärfluoreszenz zellulosischer Membranen.

An nativen zellulosischen Membranen verschiedener frisch präparierter Objekte zeigten sich folgende Fluoreszenzfarben: mattgelblich, gelbbraun, gelboliv, gelbgrünlich, gelbgrün, grünlichblau, hellblau, blau, schmutzig graublau und schmutzig grau. Es war klar, daß es sich hier nicht um die Eigenfluoreszenz der Zellulose, sondern nur um die Fluoreszenz sekundär adsorbierter Stoffe besonders aus dem Inhalt der angeschnittenen Zellen bei der Schnittanfertigung handeln konnte, worauf *Haitinger*[16] bereits aufmerksam gemacht hat; umsomehr als daneben eine ganze Reihe zellulosischer Wände entweder nur eine ganz schwache oder überhaupt keine Leuchtreaktion zeigten (z. B. Kollenchyme von Sambucus nigra, Impatiens Sultani, Pelargonium zonale). Ebenso zeigte aus Watte oder Filterpapier dargestellte reine Zellulose nach *Tamin* oder durch wiederholte Lösung in Cuoxam und durch verdünnte Schwefelsäure ausgefällte Zellulose in Wasser keine Fluoreszenz. Tatsächlich läßt sich durch mehrtägiges Waschen in fließendem Wasser die Fluoreszenz z. B. der Wände des Apfelfruchtfleisches (blau), des Wurzelparenchyms der Zuckerrübe (hellblau) oder des Stengelparenchyms des Rhabarber (hellgelbbraun) wesentlich abschwächen; dagegen kann sie durch kurze Bleichung mit Eau de Javelle (Kaliumhypochlorit) stets völlig zum Verschwinden gebracht werden.

Allerdings konnten wir feststellen, daß die Fluoreszenz der Zellulose bzw. zellulosischen Membranen von ihrem Quellungs-, also ihrem physikalischen Zustand abhängig ist. Membranen der verschiedensten Pflanzen, die im gequollenen Zustand nicht leuchten, zeigen im trockenen Zustand weißlichblaue, hellblaue oder gelbstichige Fluoreszenzfarben. Das gleiche gilt auch für die gereinigte Zellulose. Dies ist aber keineswegs eine vereinzelte Erscheinung, denn Stärke von Mais, Gerste, Weizen, Roggen und Kartoffeln verhält sich analog: im gequollenen Zustand fluoresziert sie nicht, im trockenen dagegen blau.

Die nativen zellulosischen Membranen enthalten neben Zellulose auch reichlich Pektinstoffe, und zwar besteht aus solchen die Mittel-

lamelle (*Anderson*[17]); ferner finden sie sich auch reichlich in den sekundären Wandschichten zwischen den Zellulose-Micellen (*Frey-Wyssling*[18]). Die Mittellamelle und damit auch die Pektinstoffe zeigen aber keine Primärfluoreszenz. Dies wird ferner bestätigt durch das Verhalten der kollenchymatischen Verdickungen von Solanum lycopersicum, die nach den Untersuchungen von *Anderson* aus Zellulose- und Pektinlamellen bestehen. Auch die von *Kisser*[19] näher studierten Pektinkugeln von Diefenbachia fluoreszieren nicht, desgleichen auch nicht die Intimen der Pollenkörner von Clivia nobilis, Amaryllis sp. und Hemerocallis fulva und ebenso auch nicht die Pollenschläuche von Dichorisandra speciosa, Arbutus unedo oder Lilium Martagon. Die von *Göthel*[6] an den Mittellamellen von verschiedenen Textilfasern (Hanf, Flachs, Yucca) beobachtete gelbliche bis bräunliche Fluoreszenz hat daher mit Pektinstoffen nichts zu tun und ist, wie wir uns an frischem Material selbst überzeugen konnten, auf sekundäre Stoffadsorption zurückzuführen; denn an frischem Material fluoresziert die Mittellamelle infolge ihrer Verholzung leuchtend hellblau.

Zusammenfassend läßt sich somit sagen, daß die nativen zellulosischen Zellwände verschiedene Primärfluoreszenzfarben aufweisen können, die aber nicht von den Membransubstanzen selbst, sondern von sekundär adsorbierten Stoffen herrühren und durch Reinigung der Membranen zum Verschwinden gebracht werden können. Zellulose und Pektinstoffe fluoreszieren somit im gequollenen Zustand nicht, leuchten jedoch im trockenen Zustand deutlich bläulich auf.

Die Primärfluoreszenz der nativen Holzmembranen.

Um einen Überblick über die Primärfluoreszenzfarben verholzter Zellwände überhaupt zu gewinnen, wurde zunächst an einer großen Anzahl krautiger Pflanzen aus den verschiedensten Pflanzenfamilien das diesbezügliche Verhalten der primären Holzelemente sowie der verholzten Bastfasern näher untersucht. Die vorherrschende Fluoreszenzfarbe ist blau, daneben finden sich Farben wie weißlichblau, hellblau, blaugrün, gelblichgrün und weißlichgelb. In gleicher Weise wurde das Verhalten einer großen Anzahl von Hölzern aus den verschiedensten Familien studiert. Im allgemeinen leuchten hier die Sekundärwandschichten der Holzfasern hellblau, während die Gefäßwände, die Markstrahlzellen sowie die zusammengesetzten Mittellamellen viel leuchtender und etwas heller blau sind. Es besteht hier somit anscheinend ein Zusammenhang zwischen Leuchtintensität und Verholzungsgrad, da diese Elemente bzw. Membranteile am stärksten verholzt sind, wie *Kisser* und *Sturm*[1] an Hand von metachromatischen Färbungen zeigen konnten. Die untersuchten Kernhölzer (Quercus robur, Prunus communis, Ulmus campestris, Schinopsis balansae) ergaben folgendes

Bild: der aus Gerbstoffen bestehende Zellinhalt leuchtet gelbbraun auf, die Zellwände im allgemeinen hellblau, doch ist die Blaufluoreszenz der Membranen vielfach von der gelbbraunen Fluoreszenz der Gerbstoffe überlagert, oder sie fluoresziert überhaupt nur noch gelbbraun, wobei jedoch ebenfalls Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Elementen und Membranschichten bestehen. Auch die Blaufluoreszenz des gerbstoffreichen Rotbuchenholzes zeigt stellenweise die gelbbraune Überlagerung. Werden Eichenholzschnitte mit Eau de Javelle behandelt, so zeigt sich bereits nach 20 Min. eine bedeutende Abnahme der gelbbraunen Überlagerung, noch mehr nach 30 Min., und nach einer Stunde zeigen die Membranen eine hellblaue Fluoreszenz, die allerdings bei weiterer Ausdehnung der Einwirkungszeit allmählich verschwindet. Durch vierzehntägiges Wässern von Schnitten solcher Kernhölzer (Feldulme, Stieleiche) in fließendem Wasser nimmt die gelbbraune Fluoreszenz ab, gleichzeitig aber auch die Blaufluoreszenz. Wir haben daher auch Holz untersucht, das in der Natur durch längere Zeit der Einwirkung der Atmosphaerilien ausgesetzt war, und zwar von Aststümpfen der Fichte, Tanne und Weißbuche. Ihre äußeren, unter dem Einfluß der Witterung vergrauten und verfärbten Schichten fluoreszieren braun bis gelbbraun, worauf nach innen eine Zone mit elfenbeinweißer Fluoreszenz folgt, die aber trotzdem mit den gebräuchlichen Holzreagentien positiv reagiert; nach innen schließt sich dann wieder normal blau fluoreszierendes Holz an. Da in der elfenbeinweiß fluoreszierenden Schichte keinerlei Pilzinfektionen nachzuweisen waren, konnte der Verlust der Blaufluoreszenz nur die Folge einer Auslaugung des Holzes sein. Dies wies auch den Weg für die weiteren Untersuchungen.

Untersuchungen über die Ursachen der Blaufluoreszenz der verholzten Zellmembranen.

Die im Vorhergehenden mitgeteilten Beobachtungen legten den Gedanken nahe, daß die Blaufluoreszenz auf einen wasserlöslichen Membranbestandteil zurückzuführen ist und daher extrahierbar sein müßte. Es wurden daher bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Holzspäne von Fichte, Tanne, Weißbuche und Rotbuche in einer Schliffapparatur durch 100 bzw. 200 Stunden einer Heißwasserextraktion unterworfen und dabei das Fluoreszenzverhalten sowohl des Extraktes als auch des Holzes (mikroskopisch) in gewissen Zeitabständen untersucht (Tabelle 1).

Aus Tabelle 1 ist zu entnehmen, daß die Blaufluoreszenz des Holzes mit zunehmender Extraktionsdauer immer mehr verblaßt und schließlich einem Elfenbeinweiß Platz macht. Umgekehrt nimmt die Blaufluoreszenz des Extraktionsmittels mit zunehmender Extraktionsdauer

Tabelle 1.

Holzart	Fluoreszenzfarben von	zu Beginn	nach Heißwasserextraktion von: 10 Stunden	40 Stunden	60 Stunden	100 Stunden	Trockensubstanzverlust in %
Picea excelsa (Fichte)	Holz	hellblau	hellblau	hellerblau	weißlich, gelblichgrünlichstichig	elfenbeinweiß	10,43
	Extrakt	—	meergrün	meergrün bläulich	hellblau	hellblau	
Abies alba (Tanne)	Holz	„	„	„	„	„	
	Extrakt	—	„	„	„	„	
Carpinus betulus (Weißbuche)	Holz	„	„	„	„	„	11,56
	Extrakt	—	„	„	„	„	
		zu Beginn	20 Stunden	80 Stunden	100 Stunden	200 Stunden	
Fagus silvatica (Rotbuche)	Holz	hellblau, gelblichbraun überlagert	hellblau, gelblichbraun überlagert	hellerblau ebenso gelblichbraune Überlagerung heller	weißlichblau, gelblichgrünlichstichig	schmutzig elfenbeinweiß	11,52
	Extrakt	—	schwach blaugrün	hellblau, schwach grünstichig	hellblau, schwach grünstichig	hellblau	

zu, wobei wir, um eventuelle Farbunterschiede genauer erfassen zu können, das Extraktionsmittel bei Fichte, Tanne und Weißbuche nach 10, 40 und 60 Stunden, bei Rotbuche nach 20, 80 und 100 Stunden wechselten. Die bei der Heißwasserextraktion herausgelösten Substanzen bestehen hauptsächlich aus verschiedenen Zuckerarten (darunter etwa 25% Pentosen), wasserlöslichem Lignin, Methylalkohol, Furfurol, Essigsäure und Ameisensäure (vgl. *Fuchs*[20], *Hägglund*[21]). Der blau fluoreszierende Membranteil geht beim Kochen nur langsam aber quantitativ in Lösung, dagegen werden anders fluoreszierende Substanzen rascher herausgelöst, die die anfänglich mehr grüne Fluoreszenz des Extraktionsmittels bedingen, wobei wohl eine Mischfarbe aus blau und gelb bzw. bräunlich vorliegen dürfte. Auch bei Extraktion des Holzes der Weißbuche mit heißer wäßriger 1%iger Salzsäure geht der blau fluoreszierende Anteil in Lösung, doch wird die elfenbeinweiße Fluoreszenz rascher als bei Extraktion mit heißem Wasser allein erreicht. Dagegen läßt sich durch Aethanol allein auch nach hundertstündiger Extraktion in der Hitze die Blaufluoreszenz nicht zum Verschwinden bringen: sie ist gegenüber nativem Holz nur wenig geschwächt, doch ist auch hier eine geringe Menge des blau fluoreszierenden Anteiles in Lösung gegangen.

Die nach Heißwasserextraktion elfenbeinweiß fluoreszierenden Holzmembranen zeigen aber nach Behandlung mit Phloroglucin-Salzsäure eine besonders rasch und intensiv eintretende Kirschrotfärbung, ein Beweis dafür, daß durch die blaue Leuchtreaktion und die Farbreaktion nicht das gleiche angezeigt wird. Nun fällt nach Behandlung verholzter Membranen mit Oxydationsmitteln die Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion negativ aus, was aber keineswegs eine restlose Entfernung des Lignins bedeutet. Denn wie *Jayme* und *Harders-Steinhäuser*[22] zeigen konnten, sank bei Buchenholz der Ligningehalt von 22% nach einer Behandlung mit 2%igem Natriumchlorid durch 12 Stunden bei 60° C um 3,05% auf 18,95%. Der Ligninkern, der sich mit Hilfe der von *Jayme* und *Hanke* entwickelten Reaktion mittels Stickstoff-Tetroxyd nachweisen läßt, war somit erhalten geblieben und nur jene Ligninkomponenten durch die Oxydation betroffen worden, die die Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion bedingen. Um welche Gruppe es sich dabei handelt, wurde in der letzten Zeit durch die schönen Untersuchungen von *Kratzl*[23] weitgehend aufgeklärt. Auch das in der botanischen Mikrotechnik vielfach als Bleichmittel verwendete Eau de Javelle wirkt im gleichen Sinne. Wir haben Fichtenholzmehl nach vorhergehender erschöpfender Extraktion mit Benzol-Methanol mit frisch bereitetem Eau de Javelle (820 mg Cl auf 100 ml) verschieden lange Zeit behandelt; dabei betrug der Trockengewichtsverlust nach $^1/_2$ Stunde 2,51%, nach 5 Stunden 2,99% und nach 20 Stunden 3,19%.

Behandlung von Schnitten durch verschiedene krautige Pflanzen (z. B. Pteris aquilina, Selaginella Martensii, Equisetum arvense, Iris germanica) sowie durch verschiedene Hölzer (Tanne, Fichte, Weißbuche) mit Eau de Javelle führte neben dem Ausbleiben der Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion gleichzeitig auch zu einem Verschwinden der Blaufluoreszenz, an deren Stelle z. B. weißlich-ockerstichige, hellbräunlich-olive, gelbgrüne, schmutzig graue, graublaue u. a. Farben auftreten. Daß aber zwischen der Blaufluoreszenz und der Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion keinerlei Zusammenhang besteht, geht schon aus den früher geschilderten Extraktionsversuchen mit heißem Wasser hervor. Wir haben ferner solches extrahiertes und daher elfenbeinweiß fluoreszierendes Material nun ebenfalls durch verschieden lange Zeit mit Eau de Javelle behandelt, mit dem Ergebnis, daß einerseits der negative Ausfall der Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion viel früher eintritt als bei nativem Holz, was damit zusammenhängen dürfte, daß das Oxydationsmittel in die Membranen des extrahierten Holzes viel rascher und leichter eindringen kann.

Auf Anregung von Herrn Prof. Dr. *A. v. Wacek*, Technische Hochschule Graz, verfolgten wir auch das Fluoreszenzverhalten der verholzten Zellmembran nach stufenweiser Sulfitierung bei verschiedenen Temperaturen und Einwirkungszeiten. Wo bei höherer Temperatur und Einwirkungszeit das Material bereits stärkere Mazeration zeigte, wurde es nach Waschen in fließendem Wasser mit dem Gefriermikrotom geschnitten und auf diese Weise ohne jede störende Vorbehandlung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zugänglich gemacht. Untersuchungsobjekte waren hierbei Fichten- und Buchenholz, und zwar sowohl nativ als auch durch 100 bzw. 220 Stunden mit Wasser heiß extrahiert. Es seien hier nur kurz jene Ergebnisse mitgeteilt, die auf unsere Fragestellung Bezug nehmen. Nach einer Sulfitierung von nativem Fichtenholz bei 100° C durch 5, 10 und 20 Stunden leuchten die sekundären Wandschichten und besonders die Mittellamellen kräftig blauviolett, dagegen nur hellblauviolett ohne besonders scharfes Hervortreten der Mittellamelle bei extrahiertem Holz. Buchenholz in nativem Zustand sulfitiert, zeigt ebenfalls eine leuchtend blauviolette Fluoreszenzfarbe bei gleichzeitig starkem Hervortreten der Mittellamellen, während nach der Heißwasserextraktion die Mittellamellen sich nicht mehr auffällig abheben und die Sekundärwände nach fünf- und zehnstündiger Sulfitierung eine weißliche, gelblich- bis blaugraustichige, nach zwanzigstündiger eine hellblaue bis gelbbräunliche Fluoreszenzfarbe zeigen. Durch die Heißwasserextraktion ist somit die die Blaufluoreszenz bedingende Substanz weitgehend entfernt worden. Dagegen verschwindet nach Sulfitierung bei 150° C die blauviolette Fluoreszenzfarbe und macht bei der Buche einer schmutzig bläulichen,

blaugrauen, oft etwas violettstichigen Farbe Platz, ebenso bei der Fichte, bei der jedoch die Markstrahlen und Harzgänge durch gelbliche, gelbgrüne bis gelbbraune Farbtöne abweichen.

Eine leuchtend blauviolette Fluoreszenz zeigen in gleicher Weise auch verschiedene Sulfitzellstoffe, für deren Überlassung wir Herrn Doz. Dr. *Kleinert* (Zellwolle u. Papierfabrik-A.G. Lenzing) zu Dank verpflichtet sind. Bei Heißwasserextraktion durch 100 Stunden erleidet ungebleichter Fichtenzellstoff einen Trockensubstanzverlust von 0,65% und fluoresziert nur noch leuchtend weißlichblau (im trockenen Zustand stärker als im gequollenen), das Extraktionsmittel deutlich blau. Solcher nicht extrahierter Fichtenzellstoff, durch wiederholtes Lösen in Cuoxam und Ausfällen mit verd. Schwefelsäure gereinigt, fluoresziert im gequollenen Zustand nicht mehr, im trockenen jedoch wieder schwach blau. Die kräftige blauviolette Fluoreszenz der Zellstoffe dürfte demnach auf adsorbierte Reste von sulfitiertem Lignin zurückzuführen sein.

Besprechung der Ergebnisse.

Die vorstehenden Untersuchungen haben zunächst gezeigt, daß es keineswegs möglich ist, die Primärfluoreszenz einer bestimmten Zellwand ohne nähere kritische Untersuchung als Nachweisreaktion für sie zu verwenden. Dies geht schon deutlich aus dem Fluoreszenzverhalten zellulosischer Membranen hervor, die infolge bestimmter Stoffeinlagerungen oder sekundär aus dem Zellinhalt adsorbierter Stoffe die verschiedensten Fluoreszenzfarben aufweisen können. Werden diese aber entfernt, so leuchtet die zellulosische Membran im gequollenen Zustand überhaupt nicht auf, im trockenen jedoch fluoresziert sie bläulich; das gleiche Verhalten zeigt im übrigen auch die Stärke. Da die Zellulosemembran nicht homogen ist, sondern eine ungemein feine submikroskopische Struktur besitzt, die sich im gequollenen und entquollenen Zustand durch Auseinanderrücken bzw. Zusammenrücken der einzelnen Strukturelemente räumlich ändert, so können wir daraus folgern, daß hier die Fluoreszenzerscheinung nicht an eine bestimmte Substanz, sondern an einen bestimmten Strukturzustand gebunden ist.

Dagegen fluoresziert die verholzte Zellwand im gequollenen Zustand blau und diese Farbe gewinnt beim Trocknen ebenfalls an Leuchtkraft. Andere auftretende Farben sind Mischfarben oder die Folge einer Überlagerung, wie deren Abschwächung durch längeres Auslaugen der Schnitte in fließendem Wasser zeigt. An Schnitten durch das gerbstoffreiche Eichenholz ließ sich die Überlagerung der Blaufluoreszenz durch kurze Behandlung mit Eau de Javelle völlig zum Verschwinden bringen. Auch hier liegen somit die typische Fluoreszenzfarbe beeinflussende und verändernde Stoffeinlagerungen in der Membran vor.

Wir können uns daher auch der Auffassung von *Wimmer*[10] nicht anschließen, daß die Verschiedenfarbigkeit der primären Fluoreszenz verholzender Elemente oder verschiedener Holzelemente die Folge der Verschiedenartigkeit deren Holzstoffes ist.

Was bedingt nun die Blaufluoreszenz der komplexen verholzten Zellwand? Im botanischen Sprachgebrauch gilt allgemein eine Membran als verholzt, wenn sie auf die gebräuchlichen Holzreagenzien positiv reagiert. Nach den Untersuchungen von *Jayme* und *Harders-Steinhäuser*[22], ferner von *Kratzl*[23] zeigen diese Reaktionen aber keineswegs das Lignin, sondern nur bestimmte Seitenketten desselben an. Da nun nach Behandlung von Holz mit Eau de Javelle sowohl die Blaufluoreszenz verschwindet als auch die Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion negativ ausfällt, liegt der Gedanke nahe, daß beide Reaktionen auf die gleiche Ursache zurückzuführen sind. Dies ist jedoch nicht der Fall; denn durch längere Extraktion von Holz mit heißem Wasser wird die Blaufluoreszenz zum Verschwinden gebracht und das Holz fluoresziert nur noch elfenbeinweiß, dagegen das Extraktionsmittel jetzt blau, während die Phloroglucin-Reaktion nunmehr mit besonderer Leuchtkraft eintritt. Daraus ergibt sich die grundsätzliche Feststellung, daß die Blaufluoreszenz niemals ein Charakteristikum der verholzten Membran an sich sein kann und ebenso auch nicht als Nachweisreaktion für verholzte Zellwände gelten kann. Wir neigen der Auffassung zu, daß die Ursache der Blaufluoreszenz in dem wasserlöslichen Ligninanteil der Zellwand zu suchen ist. Dafür spricht auch die Tatsache, daß von den bei der Heißwasserextraktion aus dem Holz herausgelösten Substanzen weder der Zucker (Hexosen, Pentosen) noch Methylalkohol, Essigsäure, Ameisensäure und Furfurol eine auffallende Fluoreszenz zeigen; ferner, daß mit heißem Wasser erschöpfend extrahiertes Holz nach Sulfitierung weniger stark blauviolett fluoresziert als nicht vorbehandeltes Holz. Die Beobachtung von *Wimmer*, daß die später verholzenden Steinzellen-Idioblaste von Thea japonica schon in ganz jungen Entwicklungsstadien eine deutliche Blaufluoreszenz erkennen lassen, wo die Phloroglucin-Reaktion noch vollkommen negativ ausfällt, läßt die Annahme berechtigt erscheinen, daß die Verholzung einer Membran durch das Einwandern oder die Bildung von wasserlöslichen Ligninen eingeleitet wird, die sich in der Folge dann erst zu den hochpolymeren wasserunlöslichen Ligninkörpern kondensieren (vgl. *v. Wacek*[11]).

Zusammenfassung.

Da die verholzte Zellwand ein sehr komplexes Gebilde darstellt, wurde untersucht, ob ihre blaue Primärfluoreszenz als spezifische Nachweisreaktion für Verholzung überhaupt gelten kann.

Dies ist nicht der Fall, da die Blaufluoreszenz durch erschöpfende Extraktion mit heißem Wasser (*Jayme*- und Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion positiv), ebenso aber auch durch schwache Oxydationsmittel (*Jayme*-Reaktion positiv, Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion negativ) zum Verschwinden gebracht werden kann, obwohl dadurch der Ligningehalt der Membran nur wenig verändert wird.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Blaufluoreszenz durch die vorhandenen wasserlöslichen Lignine bedingt ist.

Summary.

Since the lignified cellwall represents a very complex structure, a study was made to determine whether its blue fluorescence can serve at all as a specific test reaction for lignification. This is not the case, since the blue fluorescence can be made to disappear by exhaustive extraction with hot water (*Jayme* and phloroglucinol-hydrochloric acid reaction positive) and also by treatment with a weak oxidizing agent (*Jayme* reaction positive, phloroglucinol-hydrochloric acid reaction negative), even though the lignin content of the membrane is changed but little. It is very probable that the blue fluorescence is conditioned by the water-soluble lignins present.

Résumé.

Du fait que la paroi lignifiée de la cellule représente un dessin très complexe, on a recherché si la fluorescence primaire bleue pouvait convenir comme réaction qualitative spécifique pour le tissu ligneux en général. Ce n'est pas le cas; du fait que la fluorescence bleue, par épuisement à l'eau chaude (Réaction de *Jayme* positive ainsi que la réaction au phloroglucinol-acide chlorhydrique) et que par un oxydant faible (Réaction de *Jayme* positive, réaction phloroglucinol-acide chlorhydrique négative), elle peut être amenée à disparaître, il s'ensuit que la teneur en lignine de la membrane n'est que très peu altérée. Il est très probable que la fluorescence bleue est déterminée par les lignines préexistantes, solubles dans l'eau.

Diskussion.

H. *O. Härtel* (Graz, Österreich): Werden wasserlösliche Ligninanteile bei alkoholkonserviertem Material extrahiert und damit die Blaufluoreszenz des Holzes geändert?

H. Prof. *J. Kisser*: Die Alkoholkonservierung führt zu Sekundärfluoreszenzen, die die Blaufluoreszenz unterdrücken. Durch Alkoholextraktion wird die Blaufluoreszenz unwesentlich vermindert.

Literatur.

[1] *J. Kisser* und *M. Sturm*, Internat. Holzmarkt, Mitt. der OeGH, Folge 2, 28—34 (1949).

[2] *K. Przibram*, Mikroskopie, **2**, 68—78 (1947).

[3] *H. Lehmann*, Z. wiss. Mikroskopie, **30**, 417 (1913).

[4] *O. Klemm*, Fluoreszenzerscheinungen im Pflanzenreich, Diss. Jena 1917.

[5] *P. Metzner*, Planta, **10**, 281 (1930).

[6] *E. Göthel*, Fluoreszenzmikroskopie von Faserstoffen. Diss. Techn. Hochschule Dresden 1933.

[7] *O. Eichler*, Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Verholzung und Lignin. Zellulosechemie **1934**, 114—124; **1935**, 1—6.
[8] *G. Klein* und *H. Linser*, Österr. bot. Ztg., **79**, 125—163 (1930).
[9] *O. Vodrazka*, Z. wiss. Mikroskopie, **46**, 497—505 (1930).
[10] *Chr. Wimmer*, Mikroskopie, **3**, 225—233 (1948).
[11] *A. v. Wacek*, Holz und Chemie. Schriftenreihe d. Österr. Ges. f. Holzforschung, H. 2, 153—162 (1950).
[12] *H. Kirmreuther*, *E. Schlumberger* und *W. Nippe*, Papierfabrikant, **1926**, 397.
[13] *C. W. Leupold*, Papierfabrikant, **1926**, I, 397—398.
[14] *O. Gerngrosz* und *K. Tsou*, Papierfabrikant, **1926**, II, 497—499.
[15] *O. Gerngrosz*, Papierfabrikant. **1927** I, 49—52.
[16] *M. Haitinger*, Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie und Chemie. Leipzig 1938.
[17] *D. B. Anderson*, Sitzber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I, **136**, 429—440 (1927).
[18] *A. Frey-Wyssling*, Die Stoffausscheidungen der höheren Pflanzen, Berlin 1935.
[19] *J. Kisser*, Jahrb. f. wiss. Bot., **68**, 206—232 (1928).
[20] *W. Fuchs*, Die Chemie des Lignins, Berlin 1926.
[21] *E. Hägglund*, Holzchemie, Leipzig 1928.
[22] *G. Jayme* und *M. Harders-Steinhäuser*, Holzforschung **1947**, H. 2, 33—42.
[23] *K. Kratzl* und *F. Rettenbacher*, Monatsh. Chem., **80**, 622—633 (1949).

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien.

Fluorochromfärbung am lebenden Protoplasten.

Von

Karl Höfler.

(Eingelangt am 1. September 1950.)

Unter den modernen Methoden der Zell- und Gewebeforschung ist die Fluoreszenzmikroskopie eine der erfolgreichsten. Österreich war an der Entwicklung stark beteiligt. *Carl Reichert* hat 1911 das erste Fluoreszenzmikroskop konstruiert, dem 1913 das Luminiszenzmikroskop der Firma Zeiss gefolgt ist. Wir haben sonst heute in Wien keinen Überfluß an modernen Apparaturen, aber jedes Laboratorium besitzt die Fluoreszenzeinrichtung Lux UV von *Reichert*, bei welcher Quecksilberdampfhochdrucklampen als Lichtquelle verwendet werden. Diese Lampen liefern ein vorwiegend langwelliges Ultraviolett von 3300 bis 3900 Å, welches für lebende Zellen ziemlich unschädlich ist, viel harmloser als das scharfe, kurzwellige der Kohlenbogenlampe. — Unser großer, vielseitiger Naturforscher, Oberst Dr. h. c. *Max Haitinger*, hat im Laufe der Jahrzehnte zusammen mit der Firma Reichert die Technik der Fluoreszenzmikroskopie hoch entwickelt[1].

Wir unterscheiden mit ihm einerseits primäre oder Eigenfluoreszenz, anderseits sekundäre Fluoreszenz. Die Eigenfluoreszenz ist am pflanzlichen Gewebe vielfach schöner und kontrastreicher als am tierischen. Jede verholzte, jede verkorkte Zellwand leuchtet im UV-Licht, ohne daß man Reagenzien anwenden muß. Am bekanntesten ist die blutrote Fluoreszenz des Chlorophylls. — Am Querschnitt der Wurzel von Ranunculus alpestris (*1*) leuchtet die Rhizodermis gelb, die Exodermis blau, innen sieht man ligninführende Zellwände. Interessanter noch ist die Fluoreszenz der „Goldendodermis" der Farne (*2, 3*), deren Vorkommen auf die Filicineen beschränkt ist (*Luhan*, 1947).

Was die sekundäre Fluoreszenz betrifft, so hat an der Ausarbeitung der Methoden seit 1933 *Haitinger* den größten Anteil genommen. Die Stoffe, welche jene hervorrufen, heißen Fluorochrome. Unter ihnen

sind Verbindungen, die selbst am Tageslicht farblos sind, wie Chinin, Aesculin, Aminoterephthalsäure. Aber die wichtigsten Fluorochrome sind basische und saure Farbstoffe. — Die Fluorochromfärbung bietet große methodische Vorteile vor der Hellfeldfärbung. Sie ist im UV-Licht schon bei starker Verdünnung sichtbar. Man kann daher oft mit so niederen Konzentrationen oder Färbezeiten arbeiten, daß die lebenden Zellen ganz oder fast ganz ungeschädigt bleiben. Und vor allem, der chemisch einheitliche Farbstoff bringt verschiedene Teile des Gewebes oder der Zelle zum Leuchten in verschiedenen Farben. Solche Fluoreszenzmetachromasie ist allgemein bunter, farbenprächtiger, kontrastreicher als jene, die man mit Hellfeldfarbstoffen (Diachromen) erzielt.

Strugger[6, 7] hat das Verdienst, die Fluorochromfärbung mit der Anwendung von Farbbadreihen gestufter Wasserstoffionenkonzentration kombiniert zu haben. Er hat in umfassenden Untersuchungen die Fruchtbarkeit der Methode dargetan und hat seine Ergebnisse jüngst in zwei Büchern (1949) zusammengefaßt. Sein bevorzugter Farbstoff ist das *Acridinorange*. Ich habe *Struggers* Versuche in Wien wiederholt und kritisch nachgeprüft. Nach seinem Beispiel wurden zumal das Acridinorange und das Rhodamin B, ferner das schon von *Haitinger* als vorzügliches metachromatisches Fluorochrom empfohlene Coriphosphin HK angewandt.

Die Fluorochromaufnahmen (4, 5)* zeigen den von mir bestätigten Grundversuch *Struggers* — Zwiebelhäutchen von Allium cepa, durch 10 bis 15 Min. gefärbt mit Acridinorange 1 : 10000 — bei schwach basischer (p_H 8,3) und schwach saurer (p_H 4,8) Reaktion. Bekanntlich sind die basischen Farbstoffe bei alkalischer Reaktion meist in Form undissoziierter Moleküle vorhanden; diese sind lipoidlöslich, können das Plasma durchdringen, in den Zellsaft permeieren und werden hier gespeichert. In saurer Lösung sind die Farbstoffe ganz oder zum Großteil ionisiert, dabei ist das Farbkation der gefärbte Teil: die Ionen sind nur wasserlöslich aber lipoidunlöslich und können nicht permeieren oder intramelieren, also den lebenden Protoplasten nicht vital färben. Die Farbionen können aber elektroadsorptiv die Zellwände anfärben. Diese erfahren mit Acridinorange eine im Fluoreszenzlicht rote Tinktion.

An den Haaren von Wundklee, Anthyllis vulneraria (6), bewirkt die Behandlung mit dissoziierter Acridinorangelösung (p_H 4,8) eine interessante Elektivfärbung der Zellmembranen. Wie ist deren elektroadsorptiver Charakter nachzuweisen? Wenn man einen Tropfen ionisierter Salzlösung durch das Präparat saugt, so verschwindet die

* Leider können die Farbaufnahmen (vgl. S. 1156) zur Zeit nicht reproduziert werden. Einige Fluorochrombilder sind bei *Höfler*[4] wiedergegeben.

elektroadsorptive Färbung augenblicklich, während die „chemische Niederschlagsfärbung" (*Drawert*) der Membranen einige Zeit oder dauernd erhalten bleibt. An unserem Objekt werden sich die Haare entfärben, wenn wir n/20 $CaCl_2$ durchsaugen, aber die Ringe an der Basis der Haare werden farbig erhalten bleiben.

Von der elektroadsorptiven Färbung ist ein anderes Phänomen zu unterscheiden. Bild (7) zeigt leuchtend rote Teile der Zellwand. Es ist ein Längsschnitt durch eine junge Wurzelspitze von Allium cepa. Solche grellrote Teile entfärben sich mit $CaCl_2$ nicht. Wir nennen dies noch nicht beschriebene Phänomen im Institutsjargon „Alpenglühen". Es handelt sich wohl um eine Entmischung des absterbenden Plasmas, wobei eine Phase, die vermutlich reich an Eiweiß ist, beim Färben dies grelle Rot annimmt. Oft sind die Zellwände mit dieser Komponente des Plasmas stellenweise tingiert, sie kann aber auch innerhalb der getöteten Zellen oder in den nekrotischen Scheiden der Tonoplasten auftreten. Bettet man solche Präparate in verdünnte $CaCl_2$-Lösung, so kommt das starke Leuchten „alpenglühender" Membran- und Protoplastenteile besonders schön zur Geltung, während das Gros der vordem gleichfalls roten Zellwände durch Adsorptionsverdrängung entfärbt wird.

Wir wenden uns weiter zur Fluorochromfärbung der *Zellsäfte*. Hier hat *Strugger* nur die früher erwähnte Rotfärbung der Vakuolen am Zwiebelinnenhäutchen beschrieben. Es blieb uns eine reiche Nachlese. Als wir seit 1945 zahlreiche Zellobjekte vergleichend prüften, zeigte sich, daß meistens die Vakuoleninhalte mit Acridinorange nicht zu roter, sondern zu grüner Fluoreszenz gefärbt werden. Hier (8) die Färbung der Blattunterepidermis von Platanthera bei p_H 8,3. Prüft man in abgestuften p_H-Reihen, so zeigt sich, daß diese Grünfärbung weit in den sauren Bereich hinüberreicht. Das ist zunächst merkwürdig. Hat doch *Strugger* gemeint, daß bei saurer Reaktion nur Ionen des Acridinorange-Farbstoffs vorhanden sind, die nicht permeieren können. Die Platanthera-Zellen zeigen aber (9) die grüne Vakuolenfärbung auch noch bei p_H 3,95, also kann die Farbe doch permeieren. Meine Deutung ist, daß auch bei mäßig saurer Reaktion noch ein kleiner Prozentsatz des Farbstoffs in undissoziierter Form vorhanden ist, und zwar wird es sich um Farb*salz*moleküle handeln. Diese können durch das Plasma permeieren und sie verbinden sich in der Vakuole mit irgendwelchen dort vorhandenen Speicherstoffen. Die Verbindung zeigt im UV-Licht eine grüne Färbung. Überall reicht diese Grünfärbung in der p_H-Reihe bis weit in den sauren Bereich (vgl. z. B. die Tabellen in Biologia generalis **19**, 100 und 229 f.). Sie ist kennzeichnend für speicherstoffführende oder „volle" Zellsäfte, wie ich kurz sage. An Schnitten der Blattunterseite von Orchis maculata (*10*) sieht man leere

Zellsäfte der Epidermis und volle der Schließzellen nebeneinander. Jene sind im UV-Licht rot bei alkalischer, farblos bei saurer Reaktion, diese grün sowohl da wie dort. Leicht kann man diese schöne Metachromasie auch an ungleich dicken Schnitten von der Außenseite der Zwiebelschuppen (*11*) zeigen. Die Epidermiszellen haben „volle" Zellsäfte und werden nach Acridinorangebehandlung grün, die „leeren" Zellsäfte des darunterliegenden Parenchyms färben sich zu roter Fluoreszenz.

Warum kommt aber die Rotfärbung nicht auch im sauren Bereich zustande, wenn doch die Farbe, wie ich behaupte, eindringen kann? Ich nehme an, daß Farbbasen- (DOH-) Moleküle im Farbbad vorhanden sein müssen, damit sich „leere" Zellsäfte rot färben. Jene permeieren aus der alkalischen oder neutralen Außenlösung in den Zellsaft, der leicht sauer ist, sie dissoziieren hier und die Kationen (die beim Acridinorange vielleicht polymerisiert sind) können infolge ihrer Lipoidunlöslichkeit nicht mehr exosmieren, sie sind gefangen. Auf diese Art kann eine Anreicherung und Speicherung der Farbe zustande kommen. Die Zellsäfte wirken als Ionenfallen. Eine solche Vorstellung scheint übrigens zum ersten Mal von *McCutcheon* und *Lucké* (1924) ausgesprochen worden zu sein; sie ist aber nicht durchgedrungen, wie aus einem vorzüglichen Sammelreferat von *Scarth* (1926) zu ersehen ist, wo dieser Speichermechanismus keine Erwähnung findet.

Um meine Deutung unter Beweis zu stellen, mache ich folgenden Versuch. Ich lasse verdünnte (n/200) Ammoniaklösung zu den Zellen mit rotfluoreszierenden Säften zufließen. Wie seit *de Vries* (1873) bekannt, kann Ammoniak durch das Plasma permeieren, es macht die Zellsäfte alkalisch. Dadurch werden die Ionen wieder zu Farb(basen)-molekülen umgewandelt und diese exosmieren durch das Plasma. Wie der Versuch zeigt, werden die Zellsäfte binnen einer Minute vollkommen entfärbt (vgl. *Höfler*, 1948, S. 623 f.)[2] Bild (*12*) zeigt Zellen, die vorher gefärbt waren wie in (*4*), bei starker Vergrößerung. Der rote Farbstoff ist nach Ammoniakeinwirkung aus den Zellsäften verschwunden. Zunächst haben sich die Tonoplastenscheiden gefärbt. Jüngst ließ sich beobachten, daß durch längere UV-Bestrahlung der Farbstoff nachträglich in die Membranen verlagert wird.

Die *Zellkerne* werden im Ammoniakversuch leuchtend grün. Nach Acridinorangefärbung werden die Zellkerne von Allium manchmal rot, häufiger grün. *Strugger* wollte darin eine Lebensreaktion sehen, derart, daß die rot fluoreszierenden Kerne tot, die grünen lebend seien; er nahm an, daß in beiden Fällen der Farbstoff elektroadsorptiv an die Eiweißphase gebunden sei, daß aber durch den Konzentrationseffekt die toten Zellkerne rot werden, weil totes Plasma und tote Kerne, wie bekannt, viel mehr Farbstoff an sich reißen als lebende. Wir haben

diese Deutung bei der Nachprüfung in Wien nicht bestätigen können. Die Arbeit von *Höfler, Toth, Luhan* ist in der Zeitschrift Protoplasma[5] erschienen. Aufnahme (*13*) zeigt tote Zellkerne der Innenepidermis von Allium cepa, die, wie bei *Strugger*, mit Acridinorange zu roter Fluoreszenz gefärbt sind. Wir lassen nun n/5-Calciumchlorid zufließen und augenblicklich werden die Kerne grün. Man erkennt, daß die roten Kerne die Farbe elektroabsorptiv gespeichert hatten. Calciumchlorid verdrängt die Farbkationen. Die grüne Färbung der Zellkerne beruht hingegen auf chemischer Bindung und ist nicht elektroadsorptiver Natur. Wahrscheinlich wird die Farbe an Nukleotide gebunden. Grünfluoreszierende Zellkerne werden durch Calcium-Ionen niemals entfärbt.

Wir haben noch kurz vom *Cytoplasma* zu sprechen. Bekanntlich tritt nach Vitalfärbung der Zellsäfte mit basischen Farbstoffen in den Zwiebelhäutchen sehr oft Vakuolenkontraktion ein, wobei das leicht gequollene Plasma in den Zellecken entweder noch lebt und strömt, oder doch noch *Brown*sche Molekularbewegung der Mikrosomen zeigt oder auch schon stärker pathologisch verändert ist. Dieses Eckenplasma färbt sich (*15*) in der Fluoreszenz grün. Auch das gequollene Plasma bei Kappenplasmolyse (*16*) erscheint im UV-Licht grün gefärbt. Die Zellen hatten 24 Stunden in einer Mischlösung aus Acridinorange und 0,6-n-Kaliumchlorid verweilt. Nur in einer völlig toten Zelle ist hier das Plasma rot, der Kern aber grün gefärbt; der *Strugger*schen Lebensreaktion scheint für das Plasma immerhin eine etwas weitere, wenn auch keine allgemeine Gültigkeit zuzukommen.

Wir sprechen weiter von Färbeversuchen mit *Rhodamin B*. Es ist dies ein ausgezeichnetes Fluorochrom. *Strugger* hat gezeigt, daß das Rhodamin B der unschädlichste von allen basischen Vitalfarbstoffen ist. Es ist als „inturbanter" Farbstoff für Versuche mit lebenden Zellen besonders gut geeignet. Ferner hat *Draucert* bewiesen, daß das Rhodamin B nicht dissoziiert bzw. so schwach dissoziiert ist, daß es praktisch im ganzen physiologischen Bereich von p_H 2 bis 11 als elektroneutral gelten kann. — Wir haben *Strugger*s Ergebnisse beim Rhodamin B voll bestätigt. Es kann, wie leicht zu ersehen ist, weder die Zellwände elektroadsorptiv anfärben (was übrigens schon *Ruhland* 1908 festgestellt hat), noch Ionenfärbung in „leeren" Zellsäften bewirken. Ich zeige (*17*) „volle" Zellsäfte der konvexen Außenepidermis von Zwiebelschuppen, in plasmolysierender Farb-Zuckerlösung gefärbt. Die Zellsäfte haben Rhodamin durch chemische Bindung unter Lösungsspeicherung angereichert. Das nächste Bild (*18*) zeigt „leere" Zellen der Zwiebelinnenepidermis, mit Rhodamin B behandelt. Die Zellsäfte färben sich nicht, dafür hat aber das Plasma, das lebende Plasma, den Farbstoff reichlich aufgenommen. Es sind die Lipoide des Plasmas, die sich hier färben. Man sieht hier auch in hübscher Weise die Wirkung der

Speicherkonkurrenz. Wenn „volle" Zellsäfte die Farbe speichern, dann bleibt für das Plasma nichts übrig, weil augenscheinlich die Affinität der (ihrer chemischen Natur nach noch nicht bekannten) Zellsaft-Speicherstoffe zur Farbe größer ist. Wenn aber die Zellsäfte leer, d. h. von Speicherstoffen frei sind, dann färbt sich das Plasma kräftig an. Der Versuch gelingt mit Rhodamin B so klar, weil hier beim elektroneutralen Farbstoff die Speicherkonkurrenz der Zellmembranen ausgeschaltet wird. Ich muß hier erwähnen, daß auch die Zellen der Innenhäutchen von Zwiebeln nicht immer „leer" sind, sondern daß sie die Eigenschaften „voller" Zellsäfte zeigen können, sobald die Zwiebeln austreiben oder wenn man sie verwundet ein paar Tage liegen läßt. Dann färben sich in einem Teil der Zellen die Vakuolen mit Acridinorange grün oder gelb statt rot („Buntfärbung" nach *Höfler*, 1948). *Drawert* hat hier eine wertvolle Beobachtung gemacht, die wir bestätigen. Die Zellen der Außenepidermis geben nach Vitalfärbung die im Schrifttum wohlbekannten Entmischungskugeln (*19*), die durch das Zusammenfließen von flüssigen Niederschlagströpfchen entstehen. Die Zellen der Innenepidermis geben nur Körnchen, die unter sich gleich groß sind und unverschmolzen liegen bleiben. (Ich schlage für diese Gebilde den Namen „*Drawert*sche Körnchen" vor.) Die Speicherstoffe müssen in beiden Fällen chemisch verschieden sein. Es ist schlimm, daß man ihre chemische Natur bis heute nicht kennt!

Nur selten (*20*) erscheinen rote Entmischungskügelchen statt im Zellsaft im Plasma — so in acridinorangegefärbten Blattzellen der Kronenwicke, Coronilla varia.

Aufnahme (*21*) bezieht sich auf Fluorochromierungsversuche mit Plastiden. *Strugger* hat dargetan, daß das Rhodamin B von Plastiden vital gespeichert wird, und er hat zeigen können, daß solche gefärbte Chloroplasten bei Elodea auch noch assimilieren. Wir konnten im letzten Sommer in einer gemeinsamen Versuchsreihe mit Dozent *Schindler* an Algen aus alpinen Hochmooren beobachten, daß die Plastiden verschiedener Arten ein ganz ungleich starkes Speichervermögen für Rhodamin besitzen. Es wurde eine Lösung 1 : 10000 angewandt. Netrium digitus speichert stets sehr stark; viele andere Algen, z. B. Micrasterias, speichern im selben Versuch so schwach, daß die rote Eigenfluoreszenz der Plastiden nur wenig verändert wird. — Solche vergleichende Vitalfärbungsversuche (mit Diachromen) wurden an artenreichen Torfmoor-Algenproben früher gemeinsam mit Dr. *v. Cholnoky*, dem bekannten ungarischen Zellphysiologen, der jetzt in Holland arbeitet, auf breiterer Grundlage durchgeführt.

Prächtige Fluorochromierungsbilder liefert weiters ein Farbstoff, den unser Altmeister *Haitinger* in die mikroskopische Technik eingeführt hat. Das *Coriphosphin* ist ein vorzüglicher metachromatischer

Farbstoff. Es kann sich an Vielfarbigkeit des Fluoreszenzbildes mit dem Acridinorange messen. In einer kleinen Arbeit (*Höfler* und *Müllner-Haitinger*) wurde gezeigt, daß das Coriphosphin sich in einem Punkt vor den anderen basischen Fluorochromen auszeichnet. Es wird von den pflanzlichen Zellulosewänden viel stärker gespeichert. Ja, es scheint gewisse Eigenschaften substantiver Farbstoffe zu besitzen. In der p_H-Reihe geht die Membranfärbung bis unter den isoelektrischen Punkt bzw. Entladungspunkt der Zellulosemembranen herab. Ferner wird eine eingetretene Coriphosphinfärbung der Membranen durch Calciumsalze nur zum Teil ausgewaschen, während bei Gegenwart von Calcium im Farbbad die Färbung teilweise, aber nicht ganz blockiert wird.

Flächenschnitte von der Blattunterseite der Orchidee Platanthera (*22*) zeigen die „vollen" Zellsäfte grün im UV-Licht. Sie sehen, wie prachtvoll sattorange dabei die Membranen gefärbt sind. Der Schnitt lag in 1 : 2000 Coriphosphin + 0,4 mol Traubenzucker, die Plasmolyse ist also durch einen Nichtleiter herbeigeführt, der keine blockierende Wirkung hat. Hier (*23*) ein älteres Bild vom Jahre 1946, welches Stengelhautzellen der Orchidee Gymnadenia conopaea darstellt. Das Präparat ist unplasmolysiert. Sogar zwischen den Zellen mit grün gefärbten Vakuolen haben sich die Membranen noch ihren Teil vom Coriphosphin geholt. Erhöhte Affinität der Zellulosewände zum Coriphosphin geht also — chemisch ganz roh gesprochen — mit der substantiven Färbung Hand in Hand. Zum Vergleich ein Präparat von Orchis maculata mit fast leeren Zellsäften (*24*), es wurde in gleicher Weise mit einer Mischlösung aus schwach hypertonischem Traubenzucker und 1 : 2000 Coriphosphin gefärbt. Die Protoplasten sind nur ganz zart bläulich, sie sind eben noch sichtbar. — Wir zeigen weiter einen Schnitt von Coronilla (*25*); das Farbbad enthielt hier ein wenig (0,05 mol) Calciumchlorid; die Membranfärbung ist blockiert, die vollen Zellsäfte leuchten grün.

Die Frage war von Interesse, ob sich nicht doch auch beim Coriphosphin eine Färbung der „leeren" Zellsäfte erreichen läßt, die etwa der roten, auf Ionenspeicherung beruhenden Färbung mit Acridinorange entspricht. Da müßte das Coriphosphin wohl in großer Menge aus stark alkalischer Lösung geboten werden. Hier ein aparter Versuch (*26*), den Dozent *Schindler* vor kurzem im Wiener Laboratorium gemacht hat. Zwiebelinnenhäutchen waren mit Coriphosphin 1 : 5000, p_H 10,1, behandelt worden. Die Zellmembranen waren grell orangegelb, die Zellsäfte farblos, im Inneren des Protoplasten nur die Kerne grün. Der Schnitt wurde sodann in eine hypertonische Lösung von 0,6 mol Natriumcarbonat übertragen. Solche Sodalösung bewirkt in Zwiebelzellen eine Tonoplastenplasmolyse. In unserem Bild sind nun die Membranen entfärbt, das Plasma leicht grün, die Kerne grün und ge-

quollen, doch die isolierten, vom Tonoplasten umschlossenen Vakuolen strahlen in leuchtendem Rot. Man möchte annehmen, daß auch hier (polymere?) Farbkationen „gefangen" sind. Die plasmolysierten Tonoplasten lassen erkennen, daß die Soda nicht durch die Vakuolenwände dringen kann, denn sie dehnen sich auch bei längerem Verweilen in der Salzlösung nicht aus, was bei Aufnahme der osmotisch wirksamen Außenlösung der Fall sein müßte. Wenn die Tonoplasten schließlich platzen, dann wird die austretende Farbe im alkalischen Medium naturgemäß grün. — Der analoge Versuch mit Acridinorange (27) zeigt den Inhalt der isolierten Vakuolen in matterem Rot.

Soweit durften die Farbbilder sprechen. — In bezug auf die mikrochemische Ausdeutung der Färbeeffekte bleibt noch sehr viel zu tun. Wir haben im heutigen kurzen Querschnitt den Hauptnachdruck auf die Anwendbarkeit der Fluorochromierung im Dienst der physikalischen Chemie der Zelle gelegt.

Zum *Permeabilitätsproblem* liefern die Vitalfärbungsversuche einen grundlegenden Beitrag. Aller molekulare Farbstoff permeiert durch das lebende Plasma leicht, durchdringt den ganzen Protoplasten sozusagen widerstandslos und wird dort gespeichert, wo stärkste Affinitäten bestehen. Aller ionisierte Farbstoff, seiner Natur nach bloß wasser-, aber nicht lipoidlöslich, ist unfähig zu permeieren und kann daher niemals den lebenden Protoplasten, sondern immer nur die außerhalb der semipermeablen Schranke gelegenen Zellwände färben. Er tut dies, wie wir hörten, auf zweierlei Art, entweder elektroadsorptiv oder durch chemische Niederschlagsfärbung.

Als eine der aussichtsreichsten Anwendungen der Fluorochromfärbung erscheint nun das Studium der *Speicherkonkurrenz*, d. h. des verschiedenen Speichervermögens der Protoplastenteile, von Zellsaft, Kern und Plasma, und der Vergleich des relativen Speichervermögens von Protoplast und Zellmembran bei Anwendung verschiedener Fluorochrome und bei gestuftem p_H. — Die sonstige Verwendbarkeit der Fluorochromierungsmethoden in der Zellphysiologie und zumal auch in der Zellenpathologie — z. B. beim Studium der Plasma- und Kernentmischungen in nekrotischen Zellen — ist noch kaum abzusehen.

Zusammenfassung.

Man unterscheidet primäre oder Eigenfluoreszenz und sekundäre Fluoreszenz, die erst durch Fluorochrome hervorgerufen wird.

1. Beim basischen Fluoreszenzfarbstoff *Acridinorange* wurden nach *Struggers* Vorgang Farbbadreihen abgestufter Wasserstoffionenkonzentration angewandt. „Volle", d. h. speicherstoffführende pflanzliche Zellsäfte färben sich in weitem p_H-Bereich zu grüner Fluoreszenz; die Grünfärbung beruht auf chemischer Bindung des Farbstoffes mit zell-

eigenen Stoffen. „Leere", d. h. speicherstofffreie Zellsäfte färben sich rot im UV-Licht, doch nur oberhalb einer scharf ausgeprägten p_H-Schwelle um 6,5 bis 6,2. Die Rotfärbung beruht auf der Speicherung von Farbkationen, die im sauren Zellsaft aus endosmierenden Farbbasenmolekülen entstehen, ohne daß der Farbstoff mit Zellstoffen in chemische Reaktion tritt. Macht man die Zellsäfte mit Ammoniak alkalisch, so verschwindet die Rotfärbung, während die Grünfärbung bestehen bleibt.

2. Die Zellmembranen können entweder elektroadsorptiv oder durch chemische Niederschlagsfärbung tingiert werden. Im ersten Fall werden sie durch ionisierte Salzlösungen (Calciumchlorid) entfärbt, im letzteren nicht. Als „Alpenglühen" wird ein Phänomen erstmalig beschrieben, wo nekrotisches Plasma bzw. eine an Eiweiß reiche Entmischungsphase des Plasmas die Zellwände, die Tonoplastenscheiden oder andere tote Zellenteile durchdringt und zu grellrotem Leuchten bringt.

3. Zellkerne färben sich mit Acridinorange rot oder grün im UV-Licht. Doch ist dies keine Lebensreaktion. Die Rotfärbung toter Zellkerne beruht auf elektroadsorptiver Speicherung, die Grünfluoreszenz toter oder lebender Kerne aber beruht auf chemischer Farbbindung.

4. Das elektroneutrale *Rhodamin B* ist, wie *Strugger* fand, der unschädlichste Vitalfarbstoff. Es kann weder Zellwände elektroadsorptiv färben, noch Ionenspeicherung in Zellen mit „leeren" Säften bewirken. In solchen Zellen wird daher das Plasma gefärbt; die Speicherkonkurrenz der Zellenteile tritt besonders schön zutage.

5. Das *Coriphosphin* ist ein vorzüglicher metachromatischer Fluoreszenzfarbstoff. Es wird von den Zellwänden bevorzugt gespeichert, ähnlich den substantiven Farbstoffen. Wenn man aber gefärbte (Allium-) Präparate nachher mit Natriumcarbonat behandelt, so wird die Farbe aus den Zellmembranen getrieben, es kommt zur Tonoplastenplasmolyse und in den isolierten Vakuolen zur Speicherung von Ionen mit roter Fluoreszenzfarbe.

6. Die lipoidlöslichen Moleküle der basischen Fluoreszenzfarbstoffe durchdringen ganz allgemein fast widerstandslos die lebenden Protoplasten, um an den Zellorten stärksten Speichervermögens festgelegt zu werden. Die lipophoben Farbionen sind unfähig zu permeieren. So erhärten die Versuche in ihrer Gesamtheit die Lipoidtheorie der Plasmapermeabilität.

Summary.

A distinction is made between primary or self fluorescence and secondary fluorescence, which is evoked only by a fluorochrome.

(1) With the basic fluorescent dye, acridine orange, using *Strugger*'s procedure, dye bath series of graded hydrogen ion concentration were used. "Full", vegetable celljuices, i.e. those which carry stored materials are

stained over a wide p_H range to a green fluorescence; the green coloration is due to chemical union of the dyestuff with materials of the cell itself. "Empty", i.e., celljuices which are free of stored materials, are colored red in ultraviolet light, but only above a sharply marked p_H threshold at 6.5 to 6.2. The red coloration is due to the accumulation of dye cations, which, in the acidic celljuice, are produced from endosmosing dye base molecules, without the dyestuff entering into chemical reaction with cell stuffs. If the cell liquids are made alkaline with ammonia, the red coloration disappears, whereas the green coloration remains.

(2) The cell membranes can be tinted either by electro-adsorption or by chemical precipitation coloring. In the first case, they are decolorized by ionized salt solutions (calcium chloride), in the latter case not. As "Alpine glow", a phenomenon is described for the first time. In this necrotic plasma or an albumen-rich decomposing phase of the plasma permeates the cell walls, the tonoplastic sheats or other dead cell parts and brings them to bright red luminescence.

(3) Cell nuclei are colored red or green in ultra-violet light with acridine orange. However, this is no vital reaction. The red coloring of dead cell nuclei is due to electro-adsorptive accumulation; the green fluorescence of dead or living nuclei however is due to chemical binding of dyestuff.

(4) As *Strugger* found, the electro-neutral rhodamine B is the least harmful vital dyestuff. It can neither color cell walls electro-adsorptively, nor cause accumulation of ions in cells with "empty" juices. Therefore, in such cells the plasma is colored: the storing competition of the cell parts is made evident in especially nice fashion.

(5) Coriphosphin is an excellent metachromatic fluorescence dyestuff. It is stored preferentially by the cell walls, similar to the substantive dyestuff, however, colored (Allium-) preparations are subsequently treated with sodium carbonate, the color is driven out of the cell membranes, tonoplast plasmolysis ensues and there is accumulation of ions in the isolated vacuoles with a red fluorescence color.

(6) The lipoid-soluble molecules of the basic fluorescence dyestuffs, in general penetrate almost without resistance the living protoplasts, and are held at those places where the cell has the greatest storing power. The lipophobic dye ions are incapable of permeation. Thus the experiments, as a whole, strengthen the lipoid theory of plasma permeability.

Résumé.

On distingue entre la fluorescence propre ou primaire et la fluorescence secondaire qui est provoquée tout d'abord par les fluorochromes.

1° A côté de l'*acridine orange*, colorant basique fluorescent, des séries de bains colorés de p_H échelonnés furent utilisées d'après l'exemple de *Strugger*. «Les sucs nutritifs» c'est-à-dire les sucs cellulaires qui transportent des réserves nutritives se colorent dans un grand domaine de p_H en donnant une fluorescence verte. «Les sucs inactifs», dépourvus de matières de réserves, se colorent en rouge en lumière ultraviolette, mais seulement au-dessus d'une limite de p_H bien marquée d'environ 6,5 -6,2. La coloration rouge repose sur la mise en réserve de cations qui, dans le suc cellulaire acide, résultent de l'endosmose de molécules basiques colorées, sans que le colorant n'entre en réaction. Si l'on rend le suc alcalin avec de l'ammoniaque, la coloration rouge disparaît tandis que la coloration verte subsiste.

2° Les membranes cellulaires peuvent être colorées ou bien par électro-adsorption ou bien par précipitation colorée. Dans le premier cas, il y a décoloration par les solutions salines ionisées (chlorure de calcium); dans le second, elles ne le sont pas. Sous le nom d'«Alpenglühen» (coucher de soleil sur les Alpes), on décrit, pour la première fois un phénomène du plasma nécrotique, c'est-à-dire, une phase de démixtion du plasma des parois cellulaires riche en protéines, traversant les parois des tonoplastes ou d'autres parties mortes des cellules et y produisant une illumination rouge vif.

3° Les noyaux des cellules se colorent en rouge ou en vert en lumière ultraviolette avec l'orangé d'acridine. Cependant ce n'est pas une réaction liée à la vie. La coloration rouge des noyaux de cellules mortes repose sur la mise en réserve par électro-adsorption, mais la fluorescence verte de noyaux morts ou vivants repose sur l'existence d'une combinaison chimique colorée.

4° La *rhodamine B* au point isoélectrique est, comme l'a trouvé *Strugger*, la matière la plus inoffensive pour la vie. Elle ne peut ni colorer les parois cellulaires par électro-adsorption ni produire l'emmagasinage d'ions dans des cellules avec des sucs non-nutritifs. Dans de telles cellules, le plasma se colore cependant. La concurrence de l'emmagasinage dans les parties de cellules se voit particulièrement bien.

5° La *coriphosphine* est une excellente matière colorante pour la fluorescence métachromatique. Les parois cellulaires la préfèrent de même que les colorants substantifs. Quand on traite des préparations d'ail colorées par le carbonate de sodium, la coloration abandonne les membranes cellulaires; il se produit la plasmolyse des tonoplastes et l'emmagasinage des ions, avec fluorescence rouge, dans les vacuoles isolées.

6° Les molécules liposolubles des colorants basiques fluorescents traversent, en général sans résistance, les protoplastes vivants pour venir s'établir dans les endroits de la cellule qui possèdent le plus grand pouvoir d'emmagasinage. Les ions colorés lipophobes sont incapables d'y pénétrer. Ainsi se consolident les recherches d'ensemble de la théorie lipoïdique de la perméabilité plasmatique.

Vorgewiesene Farbaufnahmen.

Primäre Fluoreszenz:

(*1*) Ranunculus alpestris, Wurzel, quer.
(*2*) Goldendodermis der Farne: Marsilia hirsuta.
(*3*) Desgleichen: Dryopteris parasitica.

Sekundäre Fluoreszenz:

Fluorochromiert mit *Acridinorange:*

(*4*) Allium cepa, Schuppen-Innenepidermis, bei p_H 8,3.
(*5*) Desgleichen, bei p_H 4,8.
(*6*) Anthyllis vulneraria, Haare rot, Basalringe gelbbraun, Epidermiszellsäfte grün.
(*7*) Wurzel von Allium cepa, Längsschnitt, Zellwände stellenweise leuchtend rot („Alpenglüh-Phänomen").
(*8*) Platanthera bifolia, Blattepidermis, Zellsäfte leuchtend grün, p_H 8,3.
(*9*) Desgleichen, Zellsäfte mäßig stark grün, p_H 3,95.
(*10*) Orchis maculata, Blattepidermis, bei p_H 4,8 und 8,5 Aquarelle. Vgl. Tabelle in Biologia generalis Bd. 19, S. 100.
(*11*) Allium cepa, Schuppen-Außenepidermis, Stufenschnitt. Zellsäfte der Epidermis grün, des Parenchyms rot.

(*12*) Desgleichen, Innenepidermis. Entfärbung „leerer", rotfluoreszierender Zellsäfte durch NH_3. Farbe ist in die Membranen gegangen, Zellkerne noch leuchtend grün.
(*13*) Innenepidermis, Schnitt mit Alkohol getötet, Zellkerne rot.
(*14*) Dasselbe Präparat nach Zusatz von $CaCl_2$, Zellkerne grün.
(*15*) Innenepidermis, lebend, schwache Vakuolenkontraktion. Plasma in den Zellecken zartgrün.
(*16*) Desgleichen, Kappenplasmolyse nach mehrstündigem Aufenthalt in 0,6-n KCl + Acridinorange. Plasma in den Kappen grün. In einer toten Zelle Plasma grellrot, Kern grün.

Fluorochromiert mit *Rhodamin B*:

(*17*) Allium, Schuppen-Außenepidermis, die „vollen" Zellsäfte haben stark gespeichert (plasmolysiert in 0,8-mol Rohrzucker).
(*18*) Desgleichen, Innenepidermis, nur das Plasma speichert, die „leeren" Zellsäfte ungefärbt. Speicherkonkurrenz!
(*19*) Desgleichen, Außenepidermis. Diffusfärbung der Zellsäfte. In manchen Zellen Entmischungskugeln.
(*20*) Coronilla varia, Blattepidermis. Zellsäfte grün, rote Entmischungskügelchen im Plasma.
(*21*) Ungleich starkes Speichervermögen der Plastiden verschiedener Algen. Netrium digitus speichert stark, Micrasterias sehr schwach.

Fluorochromiert mit *Coriphosphin HK*:

(*22*) Platanthera bifolia, Zellmembranen leuchtend orange, Zellsäfte grün (plasmolysiert in Traubenzucker).
(*23*) Gymnadenia conopaea, unplasmol., Zellsäfte grün, Zellwände dazwischen schwach orangerot.
(*24*) Orchis maculata, Zellwände leuchtend orange, Zellsäfte fast unsichtbar (plasmolysiert in Traubenzucker).
(*25*) Coronilla varia, unplasmol. Der Farblösung war $CaCl_2$ zugesetzt. Zellwände ungefärbt (Membranfärbung blockiert!), Zellsäfte grün.
(*26*) Allium cepa, Innenepidermis. Die Zellwände waren leuchtend orange. Nach Zusatz hypertonischer Sodalösung entfärben sie, Tonoplastenplasmolyse tritt ein und nur die Zellsäfte fluoreszieren prächtig rot.
(*27*) Der gleiche Versuch mit Acridinorange. Zellsäfte matter rot.

Literatur.

(Bei den zitierten Autoren sind weitere einschlägige Literaturhinweise angeführt.)

[1] *M. Haitinger*, Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie und Chemie. Akad. Verlagsgesellschaft Leipzig. 1938.
[2] *K. Höfler*, Sitzber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl. I. Abt., **156**, 585 (1948).
[3] *K. Höfler*, Biologia generalis **19**, 90 (1949).
[4] *K. Höfler*, Mikroskopie, Sonderband Fluoreszenzmikroskopie, S. 46, (1949).
[5] *K. Höfler, A. Toth* und *M. Luhan*, Protoplasma **39**, 62 (1949).
[6] *S. Strugger*, Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Verlag Schaper Hannover. 1949.
[7] *S. Strugger*, Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Verlag Springer Berlin. 1949.

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Pharmazeutischen Fakultät Zagreb.

Zur Anwendung der Koflerschen Mikromethoden in der Pflanzenmikrochemie.

Von

D. Marković.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 3. Juni 1950.)

Aus der pharmakognostischen Praxis hervorgegangene *Kofler*sche Mikromethoden haben sich bei der Identifizierung mancher Pflanzenstoffe sehr bewährt[1]. Dabei hat die Ermittlung des Schmelzpunktes und der eutektischen Temperaturen meist genügt, um eine einwandfreie Identifizierung zu erzielen.

Manche Resultate, die bis dahin durch andere Methoden (Fällungsreaktionen, Form der Kristalle usw.) erhalten wurden, sind durch die Arbeiten *Kofler*s und seiner Mitarbeiter als teilweise oder ganz falsch gekennzeichnet. Es ist verständlich, auf welche Schwierigkeiten man in der Pflanzenmikrochemie immer wieder stoßen muß, da jede Substanz, die man irgendwie nachzuweisen bestrebt ist, in einem komplizierten System als ein kleiner Baustein eingebaut ist. Die Substanz zu isolieren, von Begleit- und Ballaststoffen zu befreien, ist immerhin eine schwere Aufgabe gewesen.

In der Pflanzenmikrochemie hat sich die Mikrosublimation bei gewöhnlichem oder vermindertem Druck schon sehr früh als sehr einfaches und brauchbares Mittel zur gleichzeitigen Isolierung und Reinigung der verschiedenen Pflanzenstoffe erwiesen[2, 3]. Leider hat man auf Grund einiger einwandfreier Resultate oft die Mikrosublimation überschätzt bzw. zu einfach aufgefaßt. Man hat geglaubt, die erzielte Reinheit und manchmal einwandfreie *Kristallform* genügen schon zur genauen Identifizierung. Manche Fällungs- oder Farbreaktionen gaben auch Anlaß dazu.

Seitdem aber *Kofler* und Mitarbeiter durch Berichtigung falscher Resultate die Grundlosigkeit solcher Annahmen bewiesen[4–7], hat die Mikrosublimation an Interesse verloren. Um einwandfreie Resultate

mit *Kofler*schen Mikromethoden zu erhalten, müssen die durch Mikrosublimation isolierten Kristalle *chemisch rein* sein. Manche, durch Mikrosublimation gewonnene Kristalle, die für ganz rein gehalten wurden, erwiesen sich bei der Schmelzpunktmikrobestimmung als unrein oder als ein Gemenge von zwei oder mehreren Stoffen. Die Arbeiten aus dem *Kofler*schen Institut haben weiter gezeigt, daß die erste Bedingung zur Gewinnung brauchbarer, untereinander vergleichbarer Resultate das genaue Einhalten der Sublimationstemperaturintervalle und anderer Versuchsbedingungen ist.

Abb. 1. Frangula-Emodin.

Bei sehr flüchtigen Stoffen — und um solche handelt es sich ja bei der Mikrosublimation sehr oft — ist die Ermittlung des Mikroschmelzpunktes wegen Verflüchtigung kleiner Mengen des erhaltenen Sublimats vor dem Erreichen der Schmelztemperatur sehr erschwert bzw. unmöglich. Für diese Fälle schlugen wir die Bestimmung der eutektischen Temperatur mit geeigneten Testsubstanzen vor[8].

Sehr oft ist wegen der großen Menge der Begleitstoffe oder wegen der Bindungsart des zu untersuchenden Stoffes die *direkte* Mikrosublimation unmöglich. In diesem Falle kann sehr oft die Extraktion zusammen mit der eventuellen Spaltung der komplexen Verbindungen und die darauf folgende Mikrosublimation zum Ziele führen[9, 10].

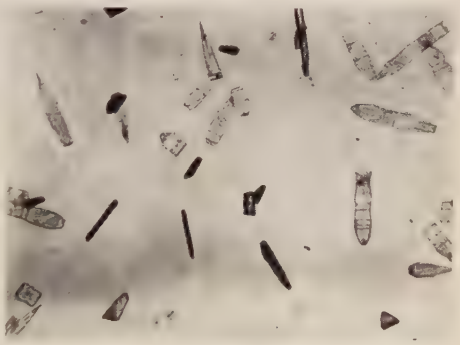


Abb. 2. Frangula-Emodinanthranol.

Im Zusammenhang mit unseren früheren Erfahrungen[8, 11] haben wir versucht, bei einer großen Pflanzenstoffgruppe die einzelnen Individuen zu identifizieren, was bisher im Mikroverfahren unmöglich war. Bei dem mikrochemischen Nachweis der Anthrachinonderivate in Drogen oder frischen Pflanzen ist man bisher über die *Gruppenreaktionen* nicht hinausgekommen. Was man bisher im besten Falle erreichen konnte, ist die Unterscheidung der oxydierten bzw. reduzierten Formen dieser Verbindungen[12]. Sogar mit der Chromatographie war nicht viel mehr zu erreichen[13–15].

Obwohl die Anthrachinonderivate sehr gut durch Mikrosublimation zu erhalten sind, ist der Nachweis der einzelnen chemischen Individuen mikrochemisch sehr schwer. In jeder Droge bzw. Pflanze kommen sehr komplizierte Gemische freier und gebundener, oxydierter oder reduzierter Derivate vor, die sich alle zusammen durch eine durchschnittlich gute Sublimierbarkeit auszeichnen. Dadurch kommt es, daß Mikrosublimate aus verschiedenen, Anthrachinonderivate enthaltenden Pflanzen ein mit Fett, Sterinen usw. verunreinigtes Gemenge darstellen. Eine Identifizierung nach *Kofler* ist da zunächst überhaupt unmöglich.

Wir versuchten nun, uns auf die verschiedene Löslichkeit der einzelnen Verbindungen stützend, mit fraktionierter Extraktion und darauffolgender fraktionierter Mikrosublimation weiter zu kommen. Anfangs scheiterten die Versuche daran, daß mit dem gesuchten Anthrachinonderivat auch die in den Pflanzen immer anwesenden Sterine, Fette, das Chlorophyll usw. mitextrahiert wurden. Nach der Anwendung des „Waschverfahrens", das wir früher auch bei den Purinderivaten mit sehr gutem Erfolg verwendeten[11], ist es uns gelungen, bei trockenen bzw. frischen Pflanzenteilen der Rubia tinctorum, Rhamnus frangula, Rhamnus Purshianus, Rhamnus fallax sehr gute Resultate zu erzielen.

Das Verfahren besteht grundsätzlich in folgendem:

Eine kleine Menge (0,01 bis 0,05 g) des Drogenpulvers bzw. der zerkleinerten frischen Pflanzenteile wird mit dem bestimmten Lösungsmittel eine gewisse (nach der Erfahrung sich richtende) Zeit in einer kleinen Eprouvette oder einem Zentrifugengläschen geschüttelt und wegen der oft kolloidal dispergierten Teilchen auf einer Handzentrifuge kurz zentrifugiert. Das dekantierte Lösungsmittel wird auf dem Wasserbad bis auf zirka 1 ml abgedampft. Der eingeengte Auszug wird auf einem Objektträger, der durch einen darunter gesetzten Metallring ringförmig erwärmt wird, abgedampft. Der Rückstand wird durch kurzes Abspülen mit bestimmten Lösungsmitteln, in welchen sich die zu untersuchende Substanz nicht löst, von Fett bzw. Sterinen größtenteils befreit und nachher der fraktionierten Mikrosublimation unterworfen. Die erhaltenen Mikrosublimate werden durch Resublimation nochmals gereinigt und identifiziert.

Auf diese Weise war es möglich, die oben genannten Pflanzen bzw. aus ihnen erhaltene Drogen auf ihren Gehalt an verschiedenen Anthrachinonderivaten in verschiedenen Vegetationsstadien zu prüfen.

Als ein plausibles Beispiel bringen wir zwei Abbildungen. Diese stellen chemisch reines Frangulaemodin bzw. Frangulaemodinanthranol dar. Die beiden Verbindungen wurden auf die oben angeführte Weise aus 0,02 g alter bzw. frischer Faulbaumrinde innerhalb zirka 40 Minuten Arbeitszeit erhalten und nachgewiesen.

Weitere, noch nicht abgeschlossene Versuche zeigen, daß der eingeschlagene Weg weitere Beiträge zur einfachen Isolierung und Identifizierung der einzelnen Pflanzenbestandteile außerhalb der Anthrachinonreihe in verschiedenen Vegetationsstadien bringen wird.

Zusammenfassung.

Zum einwandfreien Nachweis von Pflanzenstoffen mittels der *Kofler*schen Mikromethoden müssen diese Stoffe chemisch rein sein.

Sehr gut eignet sich bei vielen Pflanzenstoffen zur gleichzeitigen Isolation und Reinigung die Mikrosublimation. Sie erfolgt entweder direkt aus der Pflanze oder aus dem vorher mit einem geeigneten Lösungsmittel hergestellten Extrakt.

In der großen Gruppe der Anthrachinonderivate war die Mikroidentifizierung der einzelnen chemischen Individuen in den Mikrosublimaten bisher unmöglich, weil das direkt erhaltene Mikrosublimat eine Mischung der verschiedenen reduzierten und oxydierten Verbindungen der Anthrachinonreihe darstellt.

Es wird über ein Verfahren referiert, welches die Isolierung und Reinigung der einzelnen chemischen Individuen der Anthrachinonreihe ermöglicht. Durch fraktionierte Extraktion und darauffolgende fraktionierte Mikrosublimation ist es möglich, die einzelnen Individuen in reinem Zustande aus den verschiedenen Vegetationsstadien der betreffenden Pflanzen zu isolieren und durch *Kofler*sche Mikromethoden nachzuweisen.

Summary.

The test for vegetable materials by means of the *Kofler* micro-methods is perfectly reliable only when these materials are chemically pure. Microsublimation serves very well with many plant materials for the simultaneous isolation and purification. It may be accomplished either directly from the plant material or from the extract prepared by means of a suitable solvent.

The micro-identification of the separate chemical individuals in the extensive group of anthraquinone derivatives has hitherto been impossible by micro-sublimation, because the micro-sublimate obtained directly is a mixture of the various reduced and oxidized compounds of the anthraquinone series. A procedure is reported by which the isolation and purification of the single chemical individuals of the anthraquinone series can be accomplished. It is possible by fractional extraction and subsequent fractional micro-sublimation to isolate the separate individuals in a pure state from the different states of vegetation of the particular plants and to detect them by *Kofler*s micromethods.

Résumé.

Pour la recherche sûre des substances végétales au moyen des microméthodes de *Kofler*, ces substances doivent être chimiquement pures. La microsublimation convient très bien chez beaucoup de plantes pour l'isolement et la purification simultanée. Elle convient, soit directement à partir de la plante, soit sur un extrait obtenu préalablement avec un dissolvant

convenable. Dans le grand groupe des dérivés de l'anthraquinone, la micro-identification des individus chimiques particuliers était jusqu'ici impossible dans les microsublimats parce que ceux-ci, obtenus directement, étaient formés d'un mélange de composés divers, réduits ou oxydés, de la série de l'anthraquinone. On se réfère à un procédé d'après lequel l'isolement et la purification des individus chimiques de la série de l'anthraquinone sont rendus possibles. Par extraction fractionnée et microsublimation fractionnée ultérieure, il est possible d'isoler à l'état pur les individus unitaires, au cours des différents stades de la végétation des plantes considérées et de les soumettre aux micro-méthodes de *Kofler*.

Literatur.

[1] *L. Kofler*, Sonderdruck Beih. z. d. Z. d. Ver. Dtsch. Chemiker, Verlag Chemie, 1940. — *L.* und *A. Kofler*, Mikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische, Verlag Wagner Innsbruck. 1948.

[2] *H. Molisch*, Mikrochemie der Pflanze, 3. Aufl., Jena. 1923.

[3] *O. Tunmann* in *L. Rosenthaler*, Pflanzenmikrochemie, 2. Aufl., Berlin. 1931.

[4] *L. Kofler* und *H. Ratz*, Arch. Pharmaz. **269**, 689 (1931); **270**, 338 (1932).

[5] *L. Kofler*, Arch. Pharmaz. **270**, 293 (1932).

[6] *R. Fischer*, Pharmaz. Zentralhalle **72**, 545 (1931).

[7] *A. Kutiak*, Dissertation Innsbruck, 1935; Pharmaz. Monatsh. **15**, 212 (1934).

[8] *D. Marković*, Farm. Glasnik **2**, 255 (1946).

[9] *R. Fischer* und *E. Linser*, Arch. Pharmaz. **268**, 185 (1930).

[10] *R. Fischer* und *F. Stauder*, Pharmaz. Zentralhalle **72**, 97 (1931).

[11] *D. Marković*, Farm. Glasnik **3**, 1 (1947).

[12] *R. Wasicky*, Pharmaz. Monatsh. **5**, 250 (1924).

[13] *P. Ernst* und *G. Weiner*, Scientia Pharmac. **8**, 45 (1937).

[14] *R. Fischer* und *W. Iwanoff*, Scientia Pharmac. **13**, 29 (1942).

[15] *R. Fischer* und *W. Iwanoff*, Arch. Pharmaz. **281**, 376 (1943).

Aus dem Lektorat für Fluoreszenz-Mikroskopie an der Hochschule für Bodenkultur in Wien.

Über das Verhalten von Acridinfarbstoffen als Fluorochrome.

Von

F. Dangl.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 19. Oktober 1950.)

Haitinger[1] zeigte, daß durch Anwendung außerordentlich stark verdünnter Farbstofflösungen, sogenannter Fluorochrome, auch Präparatanteile zur Fluoreszenz gebracht werden können, welche eine solche unter normalen Bedingungen nicht aufweisen. Er nannte diese Art der Fluoreszenz „Sekundärfluoreszenz", zum Unterschied von der „Eigen- oder Primärfluoreszenz". Diese Bezeichnungen wurden auch im englischen Sprachgebiet übernommen, doch findet sich neben dem Ausdruck „fluorochromes" auch das Wort „fluors" in gleicher Bedeutung gebraucht.

Durch vereinzelte Veröffentlichungen verschiedener Forscher war schon früher auf das interessante Verhalten einzelner fluoreszierender Substanzen und deren Anwendungsmöglichkeit hingewiesen worden. So schreibt z. B. bereits 1868 *Fr. Goppelsröder*[6] in seiner Arbeit über die Morinreaktion:

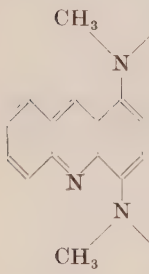
„Indem ich auf eine neue Methode der Nachweisung des Morins und namentlich der Tonerde aufmerksam mache, spreche ich die Überzeugung aus, daß dieser Fall nicht vereinzelt bleiben wird, sondern daß wir an einer Reihe organischer und unorganischer Substanzen dieselbe Eigenschaft beobachten werden: ‚nach Zusammenkommen mit anderen Substanzen, nicht aber für sich allein Fluorescenz zu zeigen'."

Bereits im Jahre 1929 erwähnt *Bommer*[2] in einer umfangreichen Arbeit seine Beobachtungen an einem mit Trypaflavin behandelten Patienten bei dem er Fluoreszenz an den Epithelien der Harnwege feststellte. Da diese Trypaflaviniösung bis zu einer Verdünnung von 1 : 1200000 fluorochromierend wirkte, erwog bereits dieser Forscher

dessen Anwendung für Vitalfärbungen und stellte auch schon fest, daß bei stärker konz. Lösungen die Elektivität der Färbung vermindert werde.

Zunächst wurde diese mikroskopische Technik von Botanikern aufgegriffen und zu ihren Untersuchungen herangezogen. Auch Bakteriologen bedienten sich verhältnismäßig frühzeitig derartiger Methoden, wie z. B. die Arbeiten von *Paul K. H. Hagemann*, *W. Herrmann* und *Ch. J. Keller* beweisen. Bereits während des Krieges veranlaßte *Strugger*[15] in Hannover Bakteriologen zu solchen Fluoreszenzuntersuchungen auch an lebenden Bakterien, wobei, abweichend von älteren Arbeiten, Acridinorange als Fluorochrom verwendet wurde.

Die Acridinfarbstoffe, denen auch die medizinisch wichtigen Substanzen Trypaflavin, Atebrin, Coriphosphin und Rivanol angehören, sind auf das Acridin zurückzuführen.



Das als Fluorochrom dienende Acridinorange wurde von *Bender* 1889 aus dem asymmetrischen Dimethyl-m-phenylendiamin aufgebaut und findet technologische Anwendung zur Färbung tannierter Baumwolle.

Es hat basischen (kathodischen) Charakter, im dissoziierten Zustande ist der fluoreszierende Anteil als Kation vertreten.

Der kathodische Charakter eines Fluorochroms ist leicht durch eine Tüpfelreaktion (Kapillarprobe) zu erkennen, wie sie *Goppelsröder*[7] 1889 im Wesen aufzeigt; *F. Feigl* hat diese Methoden 1930 weiter ausgebaut und *Liesegang* empfiehlt sie 1943 speziell für die Untersuchung von Fluorochromen.

Eine wäßrige Lösung des zu prüfenden Fluorochroms mit einem p_H-Wert zwischen 3 und 7 wird auf ein Blatt Filterpapier aufgetropft und sofort die kapillare Ausbreitung desselben unter gefiltertem UV-Licht (Analysenquarzlampe) beobachtet. Liegt die emittierte Fluoreszenzstrahlung nicht im blauen Spektralbereich, so kann in vielen Fällen auch Blaulicht zur Erregung herangezogen werden; zur Unterdrückung des sichtbaren Anteiles der Erregerstrahlung ist dann aber zwischen Objekt und Auge ein geeignetes Sperrfilter vorzusehen.

Der fluoreszierende Anteil der Lösung breitet sich kapillar wesentlich langsamer aus als das Lösungsmittel Wasser. Daher ist am Filterpapier ein stark fluoreszierender Kern mit einem nicht fluoreszierenden Wasserrand an der Peripherie zu beobachten, wie in der tieferstehenden Abbildung zu erkennen ist.

Anodische Fluorochrome zeigen bei der Kapillarprobe eine fast gleichmäßige Ausbreitung der fluoreszierenden Komponente und des wäßrigen Lösungsmittels, sind also auf einfachste Weise sofort von den

kathodischen Fluorochromen zu unterscheiden, worauf auch *Strugger* besonders hinweist.

Strugger und seine Mitarbeiter kamen zu dem Schluß, daß grüne Fluoreszenz der mit Acridinorange fluorochromierten Hefezellen und Bakterien den lebenden, hingegen rote Fluoreszenz den toten Individuen zuzuordnen sei. Hierzu muß bemerkt werden, daß mehrfach die Sprossung ziegelrot fluoreszierender Hefezellen beobachtet wurde, was der Anschauung *Struggers* widerspricht.

Auch *Ehrlich*[4] tritt in seiner 1949 veröffentlichten Arbeit für eine Beschränkung zu allgemein gefaßter Schlußfolgerungen aus den Beobachtungen *Struggers* ein.

Im allgemeinen besteht die Schwierigkeit fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen in der Herstellung hinreichend dünner Präparate, da stärkere Schichten zu Überstrahlungen führen und damit Detailbeobachtungen erschweren. In dieser Hinsicht sind jedoch durch Verwendung besonders geschliffener Objektträger Verbesserungen möglich (*F. Dangl*[3], *F. Leonhardtsberger* und *F. Pakesch*[10]).

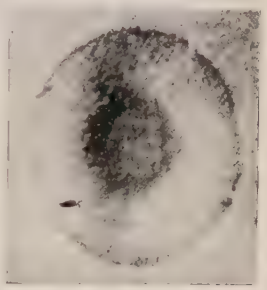


Abb. 1. Tüpfelreaktion kathodischer Fluorochrome.

Da es sich bei der Auswertung fluorochromierter Objekte um möglichst genaue Kennzeichnung der beobachteten Farbwerte handelt, genügen rein beschreibende Angaben keineswegs, da sie vielfach zu Widersprüchen führen. Auch durch die Angabe der *Ostwald*schen Farbwerte wird keine befriedigende Lösung erzielt, nur den Kollektiveindruck der verteilten Pigmente vermittelt. Spektroskopische Prüfungen stellen hier wohl den einzig gangbaren Weg dar.

Da über fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen unter Anwendung des Farbstoffes Acridinorange bereits eine größere Anzahl von Veröffentlichungen vorliegt, dürften einige zusätzliche Bemerkungen über das Verhalten desselben berechtigt sein, da parallel mit Fluoreszenzerscheinungen im allgemeinen photodynamische Wirkungen auftreten, worauf unter anderen bereits *H. v. Tappeiner*, *O. Raab*[14], *J. Gicklhorn*[5], *P. Metzner*[12] und *M. Hecht-Eleda*[9] hinweisen.

Die Energieaufnahme aus der Fluoreszenz erregenden UV-Strahlung kann photodynamische Effekte auslösen, die bekanntlich sogar zu Krankheitserscheinungen führen, aber auch, wie *M. Hecht-Eleda* aufzeigt, die Heilung begünstigen können. Aus diesem Grunde ist bei Vitaluntersuchungen möglichst energiearme, also langwellige Erregerstrahlung zu bevorzugen.

Einen Überblick über den Energiegehalt eines einzelnen Lichtquants in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichtes gibt die tieferstehende Abb. 2.

Um Vergleichswerte zu den in der Literatur gegebenen Farbangaben der Verdünnungsreihen wäßriger Acridinorangelösungen *(Strugger)* zu erhalten, wurden an reinsten Lösungen (Farbstoff von Dr. *G. Grübler*, Leipzig, in aqua bidestillata) Messungen mit dem Spektralphotometer von *König* und *Martens* durchgeführt.

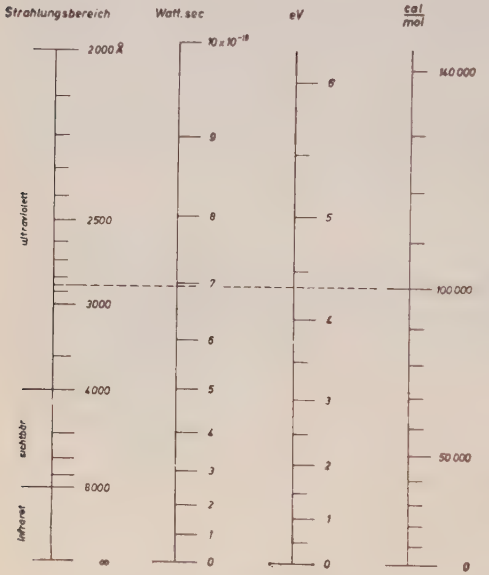


Abb. 2. Energieäquivalente.

Als Lichtquelle diente eine Wolfram-Punktlampe, die auch hinreichende UV-Intensität aufweist. Es wurde der jeweilige Extinktionswert von 10 zu 10 Å sowohl mit dem ungefilterten Licht dieser Lampe, als auch bei Zwischenschaltung einer 20%igen Natriumnitritlösung als UV-Sperrfilter zwischen Lampe und Eintrittsspalt ermittelt.

Dadurch konnten auf einfache Art und Weise charakteristische Fluoreszenzbanden festgestellt werden. Darüber hinaus ließ sich die Wirkung fluoreszenzlöschender Einflüsse, z. B. der wasserlöslichen Anteile des Glases der Aufbewahrungsgefäße verfolgen.

Wenn auch über Fluoreszenzlöschung Arbeiten ausländischer Forscher, z. B. *F. M. Pekermanns*[13], vorliegen, dürfte diese Möglichkeit einer analytischen Anwendung noch kaum ausgenützt werden, obwohl die hohe Empfindlichkeit und einfache Durchführung diesen Gedanken nahelegen.

Die von *Strugger* als „Konzentrationseffekt" bezeichneten Farbänderungen lassen sich auf diesem Wege meßtechnisch genau verfolgen.

Außer diesen allgemein bekannten Eigenschaften fluoreszierender Farbstofflösungen muß jedoch dem lichtelektrischen Verhalten derartiger Substanzen entsprechende Beachtung zuteil werden.

Setzt man eine wäßrige Acridinorangelösung in einer Elektrolysenzelle mit gleichartigen Platinelektroden der Belichtung aus und legt ein empfindliches Galvanometer an, so treten Photoströme in der Größenordnung von 10^{-8} bis 10^{-7} Å auf.

Diese Erscheinung dürfte wohl als Becquereleffekt zweiter Ordnung anzusprechen sein, über den bereits *J. Lifschitz* und *S. B. Hooghoudt*[11] sowie *Chr. Winter* und andere berichteten.

Es ist weiters zu beachten, daß sich der durch die vorerwähnte Elektronenabspaltung ausbildende Strom unterschiedlich verhält, wenn bei gleichbleibenden Elektroden reduzierende oder oxydierende Flüssigkeiten vorliegen. Modelliversuche zeigten, daß Anode und Kathode wechselweise vertauschbar sind, wenn die oberwähnten Faktoren berücksichtigt werden.

Bei der Deutung der Farbwerte vital fluorochromierter Präparate ist dieses Verhalten der Acridinfarbstoffe jedenfalls zu berücksichtigen.

Auf Grund der vorgebrachten Tatsachen darf wohl die Vermutung ausgesprochen werden, daß eine genaue meßtechnische Verfolgung verschiedener Stoffwechselprozesse mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und geeigneter Photometer zu neuen Erkenntnissen führen wird.

Zusammenfassung.

Die Notwendigkeit einer exakten Erfassung der Farbwerte verschiedener Konzentrationsstufen wäßriger Acridinorangelösungen führte zur Bestimmung der Extinktionswerte im *König-Martens*-Spektralphotometer.

Bei Sperrung des UV-Anteiles der Lichtquelle durch Natriumnitritlösung sind Fluoreszenzbanden meßtechnisch erfaßbar, ebenso Fluoreszenzlöschung durch geringe Mengen von Verunreinigungen. Bei Belichtung zeigen derartige Lösungen einen photoelektrischen Effekt, der als Becquereleffekt zweiter Ordnung anzusehen ist, und bei der Beurteilung der vital fluorochromierten Objekte berücksichtigt werden muß.

Summary.

The necessity for a precise knowledge of the color value of different concentration stages of aqueous acridine orange solutions led to the determination of the extinction values in the *König-Martens* spectrophotometer. By blocking-off the ultra-violet portion of the light source by sodium nitrite solution, fuorescence bands can be made available to measurement, and likewise, fluorescence-quenching by slight amounts of contaminants.

When illuminated, such solutions exhibit a photoelectric effect, which can be regarded as a Becquerel effect of the second order, and which must be taken into account in judging the vital fluoro-colored objects.

Résumé.

La nécessité d'une connaissance exacte des teintes des différents degrés de concentration des solutions d'orangé d'acridine conduisit à la détermination des valeurs d'extinction au spectrophotomètre de *König-Martens*. Par absorption de la partie ultraviolette de la source de lumière à l'aide d'une solution de nitrite de sodium, les bandes de fluorescence peuvent être mesurées,

de même l'extinction de la fluorescence par des petites quantités d'impuretés. Par irradiation, de telles solutions montrent un effet photoélectrique qui est à considérer comme un effet Becquerel secondaire et qui fournit la preuve des substances vitales fluorochromes.

Literatur.

[1] *C. F. Bender*, DRP. 59.179, DRP. 67.609, DRP. 68.908.
[2] *S. Bommer*, Acta derm.-vener. **10**, 253, 391 (1929).
[3] *F. Dangl*, Mikroskopie **4**, 188 (1949).
[4] *R. Ehrlich*, Milchwiss. (Nürnberg) **4**, 241, 327 (1949).
[5] *J. Gicklhorn*, Sitzber. Akad. Wiss. Wien 1914.
[6] *F. Goppelsröder*, Z. analyt. Chemie, **7**, 195 (1868).
[7] *F. Goppelsröder*, Mitt. k. k. Techn. Gew.-Mus. Wien, Sect. Chem. Gew. **1888**, 86; **1889**, 14.
[8] *M. Haitinger*, Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie und Chemie. Akad. Verlagsgesellschaft Leipzig. 1938.
[9] *M. Hecht-Eleda*, Strahlenther. **30**, 391 (1928).
[10] *F. Leonhardtsberger* und *F. Pakesch*, Wr. Z. inn. Med. **31**, 8 (1950).
[11] *J. Lifschitz* und *S. B. Hooghoudt*, Z. physik. Chem. **128**, 87 (1927).
[12] *P. Metzner*, Biochem. Z. **148**, 498 (1924).
[13] *F. M. Pekermann*, C. r. acad. sci. URSS **52**, 767 (1946).
[14] *O. Raab*, Biol. **39**, 524 (1900).
[15] *S. Strugger*, Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. M. u. H. Schaper Hannover. 1949.

Organisch-analytisches Laboratorium, Farbenfabriken Bayer, Leverkusen.

Eine Ultramikromethode zur Molgewichtsbestimmung schwerflüchtiger Stoffe* (verbesserte Apparatur).

Von

Herbert Hoyer.

Mit 5 Abbildungen.

(Eingelangt am 27. Juli 1950.)

An anderer Stelle wurde die Anwendbarkeit des Prinzips der isothermen Destillation zwischen einer Vergleichslösung und einer Lösung einer unbekannten Substanz mit gleichem Lösungsmittel zur Bestimmung von Molgewichten bei sehr kleinen Einwaagen (0,4 mg) gezeigt. Es war wünschenswert, die zunächst benutzte Apparatur für die Erfordernisse der Laboratoriumspraxis in verschiedener Hinsicht abzuändern**.

Der wesentliche Schritt war das Ersetzen der *Stock*-Ventile durch Metallventile nach *Hofer*, der gleichzeitig die Ausführung des Leitungssystems in Metall (Eisen) bedingte, wodurch die ganze Apparatur beträchtlich stabiler wurde. Sie besteht nun aus Metall, bis auf diejenigen Teile, bei denen Durchsichtigkeit erwünscht ist. Außerdem enthalten die Packungen der *Hofer*-Ventile außer Bleiwolle noch Asbest.

Die Verwendung der *Hofer*-Ventile hat weitere Vorteile: Sie lassen sich schnell bedienen, wodurch etwa $^1/_4$ Stunde Zeit bei jeder Bestimmung gespart wird. Infolge der Möglichkeit zu schnellem Arbeiten ist die Feindosierungseinrichtung der früheren Apparatur überflüssig und die Unannehmlichkeit, daß die frühere Apparatur größere Quecksilbermengen enthielt, fällt weg. Der Zwischenraum zwischen zwei Ventilen kann als Gasschleuse zum Zu- oder Ablassen kleiner Lösungsmittelmengen benutzt werden. Sehr leicht läßt sich die Lösungsmittelfein-

* Es wird nur derjenige Teil des Vortrages in den Einzelheiten reproduziert, der über eine inzwischen erschienene Arbeit über das gleiche Thema hinausgeht. S. Chemie-Ingenieur-Technik, 22, 316 (1950).

** Alleinhersteller der verbesserten Apparatur: Firma G. Kortz, Selters (Oberlahnkreis), Deutschland.

dosierung durch Änderung der Temperatur des strömenden Wassers erreichen; diese ist bei Benützung eines Hoeppler-Thermostaten bequem möglich. Die Vorratsbehälterchen für die Lösungsmittel sind nun abnehmbar geworden und können direkt gefüllt werden. Falls eines be-

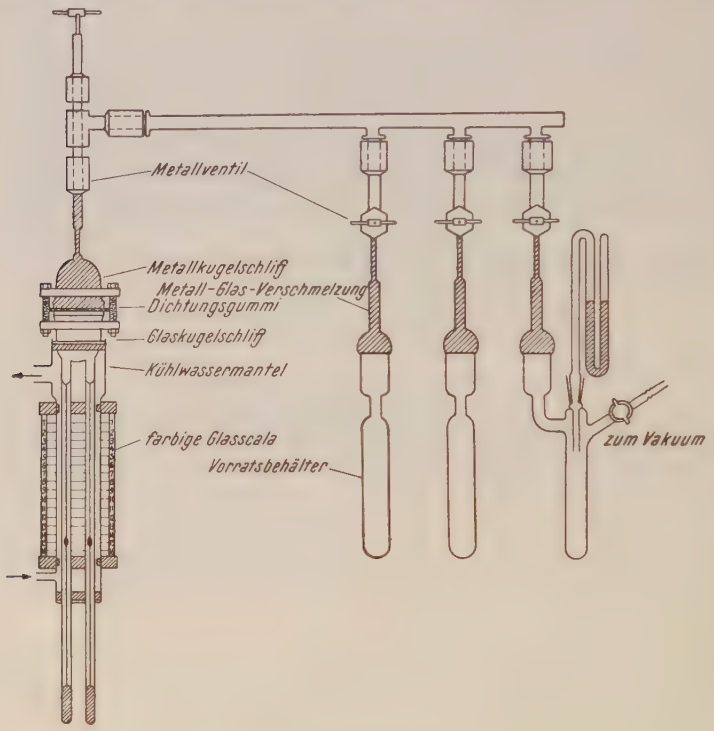


Abb. 1. Verbesserte Apparatur zur Molekulargewichtsbestimmung.

schädigt werden sollte, ist es ohne weiteres durch ein anderes ersetzbar, das durch Schraubenmuttern an der Stelle des ersten vakuumdicht angepreßt werden kann.

In der neuen Ausführungsform ist das Glas der Vorratsbehälter (Jenaer Geräteglas 20) mit den anschließenden Metallteilen direkt verschmolzen. Die Kugelschliffpfanne, an welcher der Thermometerteil angepreßt wird, besteht aus Eisen und ist als Kapillarschliff ausgebildet (Kapillarendurchmesser 2 mm). Das tote Volumen ist dabei unterdrückt.

Die Ablesung der „Thermometer" wird nun mittels einer bunten Glasskala vorgenommen (schwarze Teilung auf Milchglas, die Teilstriche für alle Ganzen grün und alle Halben rot, Breite der Teilung 4 cm), die durch Metallfedern an den wasserdurchflossenen Mantel angeklemmt ist.

Wenn mit einem Bleidichtungsring (Dicke 2 mm) zwischen Thermometerteil und der zugehörigen Kugelpfanne gearbeitet wird, besteht die gesamte Apparatur in allen wesentlichen Teilen nur noch aus Glas und Metall, da die Ventile so angeordnet sind, daß im Ruhezustand der Ap-

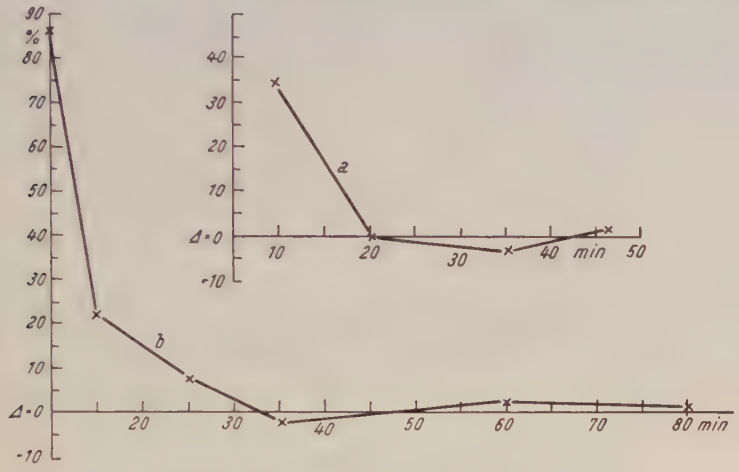


Abb. 2. o-Nitrophenol in Schwefeldioxyd.

paratur und bei der Einstellung des Lösungsmittelgleichgewichtes die Packung der *Hofer*-Ventile von den Räumen abgesperrt sind, in denen sich Flüssigkeit befindet. Diese Packungen sind nicht ideal dicht, aber infolge der gewählten Anordnung wird diese Undichtheit nur während der kurzen Zeiten zwischen Auspumpen und Öffnung der Lösungsmittelbehälter bemerkbar. Sie störte bisher nicht.

Die Dichtung aller durch Schraubenmuttern zusammengehaltenen Metallteile erfolgt, indem Konusse verschiedener Neigung aufeinander gepreßt werden.

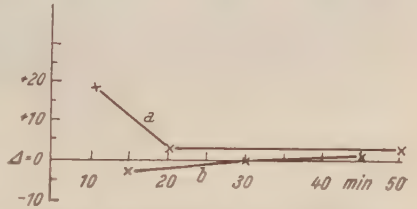


Abb. 3. Acenaphthen in Schwefeldioxyd.

Die Kugeln der „Thermometer" müssen weit genug vom Wassermantel entfernt sein, damit durch das Kühlmittel nicht Temperaturveränderungen des Kühlwassers und damit unkontrollierbare störende Destillationen hervorgerufen werden. Die neue Apparatur konnte ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen in Hinsicht auf Temperaturschwankungen in einem normalen Laboratoriumsraum aufgestellt werden.

Die Zu- und Abflußstutzen des Wassermantels sitzen (im Gegensatz zur Zeichnung) symmetrisch zu den beiden „Thermometern".

Hervorragende Molgewichtswerte konnten durch Mittelbildung erhalten werden. Durch mehrmaliges Ablesen für jeden einzelnen Meßpunkt bei wechselnder Stellung der Menisken der Quecksilberfäden lassen sich die zufälligen Ablesefehler unterdrücken, durch Mittelung über die so erhaltenen Einzelmeßpunkte auch die Fehler weitgehend ausschalten, die durch Störung der isothermen Destillation oder durch andere Ursachen bedingt sind.

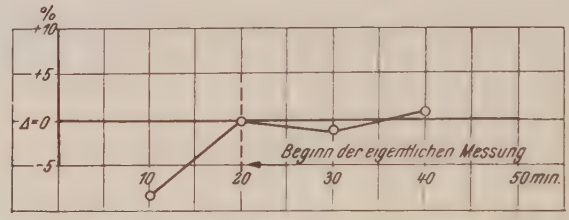


Abb. 4. Molekulargewicht von p-Toluolsulfochlorid in Chloräthyl.

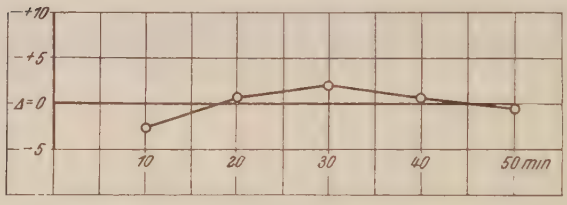


Abb. 5. Molekulargewicht von o-Nitrophenol in Butadien.

Die Abbildungen 2 bis 5 geben einen Überblick über Einstellgeschwindigkeit und Genauigkeit der Messung. Bei diesen Messungen diente stets Azobenzol als Vergleichssubstanz.

	Einwaagen.			
o-Nitrophenol	0,650 mg	0,410 mg	Azobenzol (Vergleichssubstanz)	Abb. 2a
o-Nitrophenol	0,432 „	0,358 „		„ 2b
Acenaphthen.....	0,552 „	0,444 „		„ 3a
Acenaphthen.....	0,490 „	0,350 „		„ 3b
p-Toluolsulfochlorid	0,471 „	0,613 „		„ 4
o-Nitrophenol	0,440 „	0,473 „		„ 5

Zusammenfassung.

Die Gleichgewichtseinstellung durch isotherme Destillation zwischen einer Vergleichlösung und einer Lösung einer unbekannten Substanz mit gleichem Lösungsmittel läßt sich zur Bestimmung von Molgewichten bei nur 0,4 mg Substanzeinwaage benutzen. Zeitdauer der Destillation

etwa eine halbe Stunde. Genauigkeit der Bestimmung 3% oder weniger. Als Lösungsmittel werden Stoffe verwendet, die unter Zimmertemperatur sieden wie z. B. Methyläthyläther, SO_2, Butadien, Trimethylamin. Die Messung erfolgt bei Zimmertemperatur.

Eine verbesserte Apparatur wird beschrieben, die sich gegen die früher benutzte Apparatur zur Molgewichtsbestimmung durch isotherme Destillation unter Gleichgewichtseinstellung dadurch auszeichnet, daß sie in wesentlichen Teilen, vor allem in den Absperrventilen, aus Metall besteht, wodurch außer der größeren Bruchsicherheit auch schnelleres Arbeiten erzielt wird.

Summary.

The establishment of equilibrium through isothermal distillation between a comparison solution and a solution of an unknown substance with the same solvent can be used for the determination of molecular weights with a sample of only 0.4 mg. The distillation time is about 30 minutes. The accuracy of the determination is within 3% or less. Materials which boil below room temperature are used as solvents, namely methylethyl ether, sulfur dioxide, butadiene, trimethylamine, etc.

An improved apparatus is described, which, in comparison with the set-up heretofore used for molecular weight determinations by isothermal distillation through establishment of equilibrium, is characterized by having its essential parts, especially the cut-off valves, made of metal, with the result that decreased fragility of the apparatus is accompanied by faster operating conditions.

Résumé.

L'établissement d'un équilibre par distillation isotherme entre une solution de comparaison et une solution d'une substance inconnue, dans le même dissolvant, peut être utilisé pour la détermination des poids moléculaires sur des prises d'essai de 0,4 mg seulement. La durée de la distillation est d'environ une demi-heure et la précision de la mesure est 3% ou moins. Comme dissolvants, on utilise des substances bouillant à la température ordinaire, comme l'oxyde de méthyle et d'éthyle, l'anhydride sulfureux, le butadiène, la triméthylamine. La mesure se fait à la température ordinaire. On décrit un appareil perfectionné qui se distingue des appareils précédemment utilisés pour la détermination des poids moléculaires par distillation isotherme, avec établissement d'un équilibre, parce qu'il est métallique dans ses parties essentielles et dans les soupapes de sûreté, grâce auxquelles, on peut obtenir un travail rapide, en dehors d'une grande sécurité de fractionnement.

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.

Zur Mikrobestimmung der Milchsäure.

Von

K. Lang und **K. Pfleger.**

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 20. Oktober 1950.)

Zur exakten Mikrobestimmung der Milchsäure in biologischem Material eignen sich nur die Verfahren, die auf dem Prinzip von *Fürth* und *Charnass*[1], Oxydation zu Acetaldehyd und nachfolgender titrimetrischer Erfassung desselben beruhen. Die vielen, bisher mitgeteilten kolorimetrischen Verfahren, die alle auf einer CO_2-Abspaltung durch Einwirkung konz. Schwefelsäure und anschließender Kondensation des entstandenen Aldehyds mit einem Phenol beruhen, haben sich weniger gut bewährt, weil zumeist störende Verfärbungen bei ihrer Anwendung auf biologisches Material aufzutreten pflegen.

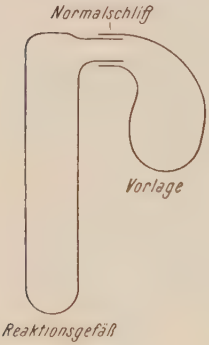


Abb. 1. Destillationsapparatur.

Im Laufe der Zeit sind nun zahlreiche Arbeitsvorschriften zur Milchsäurebestimmung nach dem Prinzip von *Fürth-Charnass* beschrieben worden. Viele von ihnen haben sich nicht bewährt, und zwar vor allem deswegen, weil die Ausbeute an Aldehyd nicht quantitativ war, sei es wegen Unvollkommenheit der Apparatur, die nicht allen gebildeten Acetaldehyd zu erfassen erlaubte, sei es wegen der ungünstigen Oxydationsbedingungen, bei denen eine Weiteroxydation des Aldehyds zur Essigsäure vorkam. Erst *Lieb* und *Zacherl*[2] sowie *H. J. Fuchs*[3] haben einwandfreie Verfahren zur Mikrobestimmung der Milchsäure beschrieben.

Leider sind die beiden Methoden von *Lieb-Zacherl* und *Fuchs* relativ umständlich. Die Durchführung einer Milchsäurebestimmung verlangt eine genaue Beobachtung zahlreicher Einzelheiten, so daß es praktisch unmöglich ist, mehrere Bestimmungen gleichzeitig von einem Untersucher durchzuführen zu lassen. Nun fällt leider bei sehr vielen physiologischen und biochemischen Fragestellungen eine große Anzahl von Milchsäurebestimmungen gleichzeitig an. Es bestand daher ein dringender Bedarf nach einem zuverlässigen, aber so einfach durchzuführenden Milchsäurebestimmungsverfahren, daß größere Reihenversuche auch ohne großen Aufwand an Zeit und Kräften möglich sind.

Vor längerer Zeit haben wir eine einfache Mikrodestillations- und Mikrodiffusionsapparatur beschrieben[1], mit der man leicht alle flüchtigen Stoffe in großen Reihenversuchen bestimmen kann. Sie besteht nur aus zwei Glasteilen, die durch einen Normalschliff zusammengesetzt werden.

Tabelle.

γ Lactat vorgelegt	γ Lactat gefunden
532	528, 538, 522, 526, 528
106	106, 106, 108, 101, 106
53	54, 59, 54, 58, 54
26	25, 29, 25, 28, 29
7	7, 7, 7, 8, 7

Je nach Bedarf wird das Reaktionsgefäß mehr oder minder stark durch Einstellen in ein passend angeheiztes Wasserbad erhitzt, die Vorlage dagegen durch Einstellen in kaltes Wasser gekühlt. Da die Apparatur klein und einfach gebaut ist und praktisch keiner Wartung bedarf, kann man sie leicht zu größeren Aggregaten vereinigen, so daß sich ohne sonderliche Mühe leicht 20, ja mehr Bestimmungen gleichzeitig durchführen lassen. Wir haben diese Apparatur mit großem Erfolg zur Bestimmung von Ammoniak, Harnstoff, Aceton und Kohlendioxyd benützt. Verluste an der zu untersuchenden Substanz sind unmöglich, da es sich um ein geschlossenes System handelt, so daß die Apparatur nach beendeter Reaktion auch längere Zeit stehen bleiben kann.

Mit dieser Apparatur läßt sich nun auch Milchsäure mit großer Genauigkeit in einfachster Art bestimmen. Als Oxydationsmittel verwenden wir Braunstein, so daß wir auf die komplizierte Tropfvorrichtung und das Luftgebläse zur raschen Fortführung des Acetaldehyds, wie man sie bei der Permanganatoxydation benötigt, verzichten können.

Im einzelnen gehen wir folgendermaßen vor:

Benötigte Reagenzien: 1. Oxydationslösung. 16 ml konz. Schwefelsäure werden auf 100 ml verdünnt. Dann fügt man 10 g Mangansulfat und 3 g Mangandioxyd hinzu. 2. 2%ige Natriumbisulfitlösung. 3. 0,005-n-Jodlösung. 4. 0,005-n-Thiosulfatlösung. 5. Etwa 0,2-n-Jodlösung. 6. Natriumhydrogencarbonat.

Durchführung: Man beschickt die Vorlage mit 5 ml Bisulfitlösung und das Reaktionsgefäß mit 5 ml der zu untersuchenden Lösung und 2 ml Oxydationsreagens. Die Schliffteile werden unter Erwärmen mit einem möglichst hoch schmelzenden Paraffin bestrichen, worauf man den Apparat zusammensetzt. Der Reaktionskolben wird nun durch einen Mikrobrenner erwärmt. Sobald die Flüssigkeit ins Sieden kommt, wird die Flamme soweit zurückgedreht, daß die Flüssigkeitsoberfläche gerade eben mit Schaum bedeckt bleibt als Zeichen eines ganz schwachen Siedens. Während der ganzen Zeit taucht die Vorlage in kaltes Wasser ein und der Schliff wird durch Auftropfen von kaltem Wasser gekühlt. Die Destillation ist in etwa 15 Min. beendet. Man nimmt den Apparat auseinander und ermittelt den übergegangenen Aldehyd in bekannter Weise jodometrisch, bei sehr kleinen Milchsäuremengen unter Verwendung einer Mikrobürette.

Die Leistungsfähigkeit des Analysenverfahrens geht aus der vorstehenden Tabelle hervor.

Zusammenfassung.

Es wird ein Verfahren zur Mikrobestimmung von Milchsäure nach dem Prinzip von *Fürth* und *Charnass* beschrieben. Als Oxydationsmittel wird Braunstein an Stelle von Permanganat verwendet. Dadurch ist eine weitgehende Vereinfachung des Destillationsapparates möglich.

Summary.

A method is described for the micro-determination of lactic acid, based on the *Fürth* and *Charnass* principle. Manganese dioxide is used as oxidant in place of permanganate. This permits a far-reaching simplification of the distillation apparatus.

Résumé.

On décrit un procédé de microdosage de l'acide lactique d'après le principe de *Fürth* et *Charnass*. Comme agent d'oxydation, on prend le bioxyde de manganèse à la place du permanganate. Il est alors possible de simplifier considérablement l'appareil de distillation.

Literatur.

[1] *O. v. Fürth* und *D. Charnass*, Biochem. Z. **26**, 199 (1910).
[2] *H. Lieb* und *M. K. Zacherl*, Z. physiol. Chem. **211**, 211 (1932) und **231**, 88 (1935).
[3] *H. J. Fuchs*, Z. physiol. Chem. **221**, 271 (1933).
[4] *K. Lang*, Klin. Wschr. **18**, 913 (1939).

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Prozenttabellen organischer Verbindungen.

Von

Friedrich Kuffner und Wilhelm Gruber.

(Eingelangt am 4. Januar 1951.)

Um die Ergebnisse einer Elementaranalyse auswerten zu können, müssen sie mit den für die erwartete Bruttoformel berechneten Werten verglichen werden, welch letztere man gewöhnlich auf logarithmischem Wege ermittelt, weil angesichts der modernen Reinigungstechniken und der immer mehr verfeinerten (mikro-)analytischen Methoden zwei Dezimalen angegeben werden können und sollen, wozu der Rechenschieber meist nicht exakt ausreicht. Wird nach einiger Zeit, etwa für ein Isomeres, derselbe Wert wieder benötigt, wird er meist neu berechnet, sofern man sich nicht zufällig erinnert, ihr schon einmal gerechnet zu haben. Selbstverständlich birgt die organische Literatur in den Arbeiten zahlreicher Autoren ein riesiges Reservoir solcher „theoretischer" Werte (von denen freilich manche ungenau sein können), das niemand auswertet, so daß in summa die Organiker ein und dieselbe Rechnung unnötig oft durchführen.

Diese nutzlose Arbeit könnte vermieden werden, wenn die einmal ausgerechneten Werte, von denen allerdings feststehen müßte, daß sie fehlerlos und ohne unzulässige Abrundungen (mit den neuesten Atomgewichten) berechnet wurden, in geeigneter Weise gesammelt würden. Im Druck hat 1912 *M. M. Richter* eine solche Sammlung von Prozentzahlen als Sonderdruck aus der 2. Auflage seines „Lexikons der Kohlenstoffverbindungen" herausgegeben. Es scheint aber, daß dieses Werk in der Praxis wenig Beachtung gefunden hat, jedenfalls ist keine weitere Auflage davon erschienen. Dies mag daran liegen, daß die Rechnung durchwegs mit abgerundeten Atomgewichten und nur mit einer Dezimale durchgeführt wurde, wofür ja schon der Rechenschieber genügt, vielleicht auch daran, daß die Anordnung die gleiche ist wie im Formelregister. Wenn dieses System seinen eigentlichen Zweck auch heute noch ausgezeichnet erfüllt, so gestattet es doch bei der Verwendung für eine Prozenttabelle die Auffindung des berechneten Wertes nur in dem bisher

besprochenen Falle, wenn nämlich der gefundene Wert der Erwartung entspricht, nicht aber in dem gleichfalls häufigen Falle, in welchem ein überraschendes Analysenresultat erhalten wird. Überdies ist nicht recht erfindlich, warum *Richter* Zusammensetzungen wie $C_{14}H_2$, $C_{24}H_2$ oder $C_{20}H_2O$ aufgenommen hat, denen weder damals noch heute oder in absehbarer Zukunft eine reale Verbindung entspricht; und schließlich sind die *Richter*schen Tabellen nicht fehlerfrei.

Wir haben deshalb seit 1933 die exakten Prozentzahlen der am hiesigen Institut am häufigsten benötigten Bruttoformeln in übersichtlicher Weise mit einer Genauigkeit von 2 Dezimalen tabelliert und die errechneten Werte mit dem gleichfalls ausgerechneten, aber nicht niedergeschriebenen Sauerstoffwert auf 100,00% kontrolliert. Diese Tabellen wurden später systematisch ausgebaut, so daß sie heute 9000 „Tabellenquadrate" umfassen, von denen jedes einer einzelnen Bruttoformel, aber natürlich einer ganzen Schar von Isomeren entspricht. Der überwiegende Teil der Zahlen ist statt mittels der Logarithmischen Rechentafeln für Chemiker (von *Küster-Thiel*) mit Rechenmaschinen berechnet worden; da diese aber nur ab-, nicht auch aufrunden konnten, haben wir die benötigten Werte auf 3 Dezimalen berechnet und dann nach den üblichen Regeln auf- bzw. abgerundet, so daß auch diese Werte absolut exakt sind*.

Unser System, von welchem die beigegebene Abbildung einen Ausschnitt darstellt, besteht darin, daß Verbindungen mit gleicher Anzahl der O- und N-Atome zu einer Tafel zusammengefaßt werden, in der die Anzahl der C- und der H-Atome als eine Art Koordinatensystem dient. Es ist also beispielsweise in der vorliegenden Probetabelle (Verbindungen mit 3 O- und 1 N-Atom) die Zusammensetzung $C_{16}H_{15}O_3N$ ebenso leicht zu finden wie etwa im *Richter*schen Werk (71,36% C, 5,61% H, 5,20% N, Rest O). Aus arithmetischen Gründen steigen z. B. in der Kolonne H_{17} die C-Werte (bei fallenden H-Werten) von oben nach unten, die H-Werte z. B. in C_{17} von links nach rechts (bei fallenden C-Werten); in diagonaler Richtung (d. h. beim Aufwärtsschreiten innerhalb einer homologen Reihe) steigen C- und H-Wert von links oben nach rechts unten**; und schließlich können wir, wenn wir von einem betrachteten Felde ungefähr im „Rösselsprung" weitergehen, *einen* Wert ungefähr konstant halten, den anderen im entsprechenden Sinne variieren. Schon mit geringer Übung finden wir daher in unserer Probetabelle z. B. die zu

* Der Österreichischen Nationalbank danken wir auch an dieser Stelle bestens für die Überlassung von Rechenmaschinen.

** Diese Regel gilt nicht allgemein; erstens ist bekanntlich die Zusammensetzung aller Kohlenwasserstoffe $(CH_2)_n$ die gleiche, nämlich 85,6% C und 14,4% H. Ferner zeigen alle Homologen $C_nH_{2n-16}O$ u. dgl. zwar normal steigende H-Werte, aber gleiche C-Werte, schließlich fallen bei homologen Reihen mit noch weniger Wasserstoff die C-Werte sogar, während Wasserstoff steigt.

69,5% C und 6,5% H am besten passende Bruttoformel schnell, wenn beispielsweise unser Blick zuerst auf das nicht brauchbare Feld $C_{14}H_{13}O_3N$ fällt, nämlich bei $C_{15}H_{17}O_3N$. Damit ist also auch die für die *Richter*schen Tabellen, die besser als Listen zu bezeichnen sind, nicht lösbare Aufgabe, den berechneten Wert auch bei überraschenden Analysen aufzufinden, mit den vorliegenden Tabellen in wenig Sekunden (10 bis 20 im Durchschnitt) zu lösen, wenn man über die Zahl der O- und N-Atome unterrichtet ist. Dies wird natürlich oft nicht der Fall sein, doch ist man in der Regel so weit informiert, daß man bei Durchsicht von einigen wenigen Tafeln den gesuchten Wert findet (man weiß z. B.: es müssen mindestens

O_3N	H_{13}	H_{15}	H_{17}	H_{19}	H_{21}
C_{14}	69,12 5,39 5,76	68,55 6,16 5,71	67,99 6,93 5,67	67,45 7,68 5,62	66,90 8,42 5,57
C_{15}	70,58 5,13 5,49	70,02 5,88 5,45	69,48 6,61 5,40	68,94 7,33 5,36	68,41 8,04 5,32
C_{16}	71,90 4,90 5,24	71,36 5,61 5,20	70,83 6,32 5,16	70,30 7,01 5,13	69,79 7,69 5,09
C_{17}	73,10 4,69 5,02	72,58 5,38 4,98	72,06 6,05 4,94	71,56 6,71 4,91	71,05 7,37 4,88
C_{18}	74,21 4,50 4,81	73,70 5,15 4,78	73,20 5,80 4,74	72,71 6,44 4,71	72,21 7,07 4,68

2 O-Atome vorhanden sein; oder: es können höchstens 20 C-Atome vorhanden sein; oder: die Verbindung ist stickstofffrei usw.). So wird das unbeliebte Berechnen einer Bruttoformel, zu welchem man außerdem einen genauen N-Wert haben sollte, kaum mehr notwendig, was eine überaus lästige, nicht immer in durchgehend logarithmischer Rechnung mögliche Arbeit vorstellt, bei der minder geübte Rechner gar nicht selten straucheln.

Wir glauben, daß unser System allen übrigen ebenso überlegen ist, wie ein Atlas einem geographischen Lehrbuch. Während bisher die Satzkosten die Drucklegung des Werkes, welches derzeit 34000 ausgerechnete Werte enthält (und dazu die Molekulargewichte und die Mantisse ihres Reziprokwertes), erschwert haben, sehen wir in dem jetzt auch in Europa bekannt werdenden „Vari-Typer"-Verfahren einen Weg, der unsere seit 1948 laufenden Bemühungen, einen Verleger zu finden, erfolgreich machen könnte.

Zusammenfassung.

Es wird ein in langjährigem Gebrauch bewährtes System der Anordnung der Prozentzahlen organischer Verbindungen beschrieben, das nicht nur das rasche Auffinden der für eine bestimmte Bruttoformel berechneten Werte erlaubt, sondern ebenso leicht das Auffinden der mit gefundenen Werten verträglichen Bruttoformeln.

Summary.

An arrangement of percentages of organic compounds is described allowing to find calculated percentage for each formula as well as formula from analytical figures.

Résumé.

On décrit un système d'arrangement des compositions centésimales des combinaisons organiques. Ce système permet de trouver les valeurs calculés de la formule brûte aussi bien que la formule brûte d'après les valeurs trouvés.

Über die wissenschaftlichen Ergebnisse des I. Internationalen Mikrochemischen Kongresses.

Von

F. Hecht, Wien.

(Eingelangt am 23. Dezember 1950.)

Wenn man aus den mehr als 120 Vorträgen, die auf dem IMC in Graz (2. bis 6. Juli 1950) gehalten wurden, Schlußfolgerungen ableiten will, in welchen Richtungen sich wohl in nächster Zukunft die Entwicklung der Chemie bewegen dürfte, muß man dies von folgenden fünf Gesichtspunkten aus tun:

1. Apparative Hilfsmittel;
2. Arbeitsmethodik;
3. Anwendungsgebiete;
4. Unterricht;
5. Literatur.

Die Vorträge verteilten sich annähernd gleich zahlreich auf die allgemeine und die angewandte Mikrochemie. Angesichts der Tatsache, daß auf dem Kongress die Elite der Mikrochemiker vertreten war, darf man daraus wohl statistisch erstaunlicherweise schließen, daß in der Gegenwart annähernd gleichmäßiges Interesse besteht: einerseits am Ausbau der Apparaturen und der allgemeinen Methodik, anderseits an der Anwendung der Apparaturen und Verfahren auf die Probleme, die sich in den Teilgebieten der Chemie und ihrer Nachbarwissenschaften stellen.

Im folgenden soll nach obigen fünf Gesichtspunkten in großen Umrissen — also unter bewußter Ausschaltung allzu vieler Einzelheiten — eine Analyse der wissenschaftlichen Kongressergebnisse versucht werden.

1. Apparative Hilfsmittel.

Ein Hauptinteresse der Mikrochemiker richtet sich nach wie vor auf die Konstruktion empfindlicher *Mikrowaagen*, die eine möglichst einwandfreie Wägung sehr kleiner Substanzmengen mit einer Genauigkeit von 1 γ oder sogar in besonderen Fällen von Bruchteilen eines γ gestatten

sollen. Dies ist dadurch bedingt, daß immer mehr die Notwendigkeit der Einführung und Anwendung von Gammaverfahren auftritt, während die frühere Mikroanalyse sich im wesentlichen auf die Milligrammverfahren beschränkte. Man versucht derzeit, diese Ultramikroanalyse vor allem mit Hilfe mikrovolumetrischer oder -kolorimetrischer Methoden zu ermöglichen. Diese hauptsächlich von den USA ausgehende Forschungsrichtung kam trotz ihrer überragenden Bedeutung eigentlich auf dem Grazer Kongress nicht entsprechend zur Geltung.

Es besteht aber immer noch Bedarf an gewöhnlichen mikrochemischen Waagen und Halbmikrowaagen, die eine Genauigkeit von wenigen γ bzw. 0,01 bis 0,02 mg (im Falle der Halbmikrowaagen) aufweisen und nach fast allgemeiner Einführung von Luftdämpfung und Projektionsablesung eine schnelle Ausführung der Wägungen ermöglichen. Dadurch soll die Hauptunannehmlichkeit der Mikrogravimetrie, nämlich die umständliche und langwierige Ausführung der Mikrowägungen nach der alten Schwingungsmethode, beseitigt werden. Diese Forderung wird vor allem von den Industrielaboratorien erhoben. Dem allgemeinen Streben nach Automatik kommt das verbesserte Modell der *Eigenberger*schen Mikro-Auftriebswaage entgegen.

Die Ausstellung mikrochemischer Geräte zeigte äußerst interessante Waagentypen deutscher, englischer, schweizerischer und französischer Waagenbaufirmen.

Die feinmechanische und die optische Industrie haben ein besonders gewichtiges Wort bei der apparativen Entwicklung der Mikrochemie mitzureden. Die Entwicklung der organischen Mikroelementaranalyse schlägt den Weg zur Automatik ein. Bis vor kurzem hatte allerdings die automatischen Apparaturen in der Regel jedes Mikrolaboratorium selbst gebaut, doch beginnt die Industrie schon leistungsfähige Serienmodelle herzustellen (z. B. Norstedt & Söner in Schweden sowie Hösli in der Schweiz).

Für die modernen „Tracer-Methoden" der Radiochemie wird bereits von einer österreichischen Firma, den Seco-Werken, ein Zählgerät hergestellt.

Nach wie vor bedarf die Mikroanalyse hochwertiger *Platingeräte*, wie sie die altbekannten deutschen Platinschmelzen in Hanau am Main herstellen. Auch über die unveränderte Bedeutung der ausgestellten Erzeugnisse der Jenaer Glaswerke Schott & Gen. ist kaum ein Wort zu verlieren. Die Geräte aus dem neuerdings bewährten Wiener WIRAG-Glas wurden gleichfalls gezeigt.

Während bis vor wenigen Jahren die meisten Mikrolaboratorien der Erde die *Glasgeräte* von der Firma Paul Haack in Wien bezogen, die ja immer noch als führend auf diesem Gebiete zu bezeichnen ist, muß es als Folge der Weltlage und Weltentwicklung angesehen werden, daß in

vielen Ländern eigene Glasbläserfirmen nunmehr solche Mikrogeräte selbständig herstellen.

Zu wenig vertreten waren in Graz die optischen und elektrotechnischen Firmen, insbesondere die Hersteller lichtelektrischer Meßgeräte (Kolorimeter, Spektrophotometer). Der Bedeutung der *Fluorescenz- und Luminescenzanalyse* und der *mikroskopischen Methoden* wurde die Firma C. Reichert, Wien, gerecht.

2. Arbeitsmethodik.

Die außerordentliche Ausweitung der Anwendung verschiedenster Arbeitsmethoden für mikrochemische Untersuchungen wurde durch den Kongress ausgezeichnet beleuchtet. Während in den Anfängen der Mikrochemie Mikromethoden vor allem bei Mangel genügend großer Mengen an Untersuchungsmaterial benützt wurden, geht man heute mehr und mehr dazu über, Mikromethoden auch dann zu verwenden, wenn ihre Vorteile in der bloßen *Zeit-*, *Arbeits-* und *Reagenzienersparnis* liegen. Moderne Technik, wissenschaftliche Forschung und klinische Untersuchungen zwingen zu ungezählten Serienanalysen, die nur durch Mikromethoden bewältigt werden können.

Die immer weitergehende Vertiefung unserer Kenntnisse über die Feinstruktur der Materie und ihrer einzelnen Bausteine und Aggregate läßt der bereits im Abschnitt 1 erwähnten *Ultramikroanalyse*, also dem Verfahren zur Ermittlung noch kleinerer als Gammamengen, allmählich fundamentale Bedeutung zukommen. Es ist nicht daran zu zweifeln, daß die qualitative und die quantitative Mikroanalyse in der nächsten Zeit sich in großem Umfange dieses Forschungsgebietes bemächtigen werden. *A. A. Benedetti-Pichler* und *P. L. Kirk* haben in verschiedenen früheren Veröffentlichungen gezeigt, daß dabei mit verhältnismäßig einfachen Hilfsmitteln das Auslangen zu finden ist; sie haben somit die Tradition *F. Emichs* gewahrt, der gleichfalls mit ganz geringen Hilfsmitteln die Grundlage der anorganischen Mikroanalyse gelegt und erstaunliche Ergebnisse erzielt hat.

Auch eine andere, besonders aussichtsreiche Methodik der Mikroanalyse kam in Graz nicht gebührend zu Worte — abgesehen von ganz wenigen Vorträgen —, nämlich die „*Tracer-Methoden*", d. i. die Spurenanalyse mit Hilfe radioaktiver Isotoper. Diese Verfahren sind in Europa zwar in ihrer Wichtigkeit begriffen worden, ihre Anwendung liegt aber auf diesem Kontinent noch in den Anfängen, was durch naheliegende technische Gründe bedingt ist. Der Nutzen dieser revolutionierenden Arbeitstechnik kann gar nicht hoch genug eingeschätzt werden.

Daß Anwendung und ständiger Weiterausbau der *organischen Mikroelementaranalyse* noch andauernd im Vordergrund des Interesses stehen, beweist die große Zahl von Vorträgen aus diesem Teilgebiet, nämlich

rund 10% aller Vorträge! Die Fortentwicklung in dieser Sparte ist sicherlich noch nicht zu Ende, doch ist die Automatisierung der Apparaturen, wie schon gesagt, wohl als endgültig entschiedene Tatsache anzusehen. Von besonderer Bedeutung ist eine neue Methode von *J. Unterzaucher*, ein jodometrisches Mikroverfahren betreffend, mit dem nicht nur der früher aus der Differenz ermittelte Sauerstoff, sondern auch in ähnlicher Weise der Kohlenstoff und der Wasserstoff bestimmt werden können. Daß in der organischen Mikroelementaranalyse das Bedürfnis nach weitgehender Standardisierung der Apparaturen und ihrer einzelnen Teile besteht, beweisen die grundlegenden Ausführungen *H. K. Albers* über dieses Thema, dem ausgedehnte Vorbereitungsarbeiten für eine Normierung zu danken sind. Durch die Gründung eines eigenen Fachausschusses für dieses Gebiet wurde dem allgemeinen Wunsch der Mikrochemiker aller Länder Rechnung getragen.

Auch die Bestimmung *funktioneller Gruppen und einzelner organischer Verbindungen* hat ihre Wichtigkeit nicht eingebüßt. Noch immer wird für letzteren Zweck vielfach die Kolorimetrie benützt. Eine Weiterentwicklung photoelektrischer Meßgeräte für die *Spektrophotometrie* ging aus den Kongressvorträgen kaum hervor.

Aus den Vorträgen sowohl wie aus der mikrochemischen Literatur ist die noch immer zunehmende Anwendung *organischer Reagenzien* für Kolorimetrie und Mikrogravimetrie zu ersehen, wobei vielfach metallorganische Komplexe und ihre Löslichkeit bei verschiedenem p_H in organischen Lösungsmitteln benützt werden. Dieses Gebiet ist noch außerordentlich ausbaufähig.

In der anorganischen und organischen Mikroanalyse beginnt vielfach die *Emich*sche Filterstäbchenmethodik durch die *Fällung im Spitzröhrchen* und nachfolgendes *Zentrifugieren* ersetzt zu werden.

Die klassische *anorganische Mikrovolumetrie* wird weiterhin durch Ausarbeitung neuer Methoden für Spezialfälle und Anwendung neuer Redox-Indikatoren ausgebaut.

Die *Mikrogravimetrie* dürfte einen neuen Auftrieb durch die Arbeiten von *Cl. Duval*, Paris, über Thermolyse gravimetrischer Fällungs- und Wägungsformen erhalten. Dieser Forscher bestimmt mit einer Thermowaage die Zusammensetzung und richtige Wägungstemperatur zahlreicher Fällungen und Niederschläge, die für gravimetrische Bestimmungen bisher verwendet wurden oder in Frage kommen.

In den letzten zehn Jahren hat die *anorganische Chromatographie* einen großen Aufschwung mitgemacht; dadurch werden immer wirksamere Anreicherungsverfahren für *Spurenelemente* ermöglicht. Diese Elemente werden auch oft gruppenweise durch Ausschüttelung organischer Metallkomplexe mit organischen Lösungsmitteln angereichert oder aus Lösungen entfernt. *Gruppenfällungen von Metallen* bieten auch

Anreicherungsmöglichkeiten für die *Spektralanalyse*. Alle diese Themen wurden durch einzelne Vorträge behandelt.

Leider nur gestreift wurde die *Röntgenstrahlenanalyse*, die sich vor allem in den angelsächsischen Ländern durchsetzt. Hingegen wurde die *Spektrochemie* — quantitative spektralanalytische Methoden — umfangreicher behandelt, vor allem in dem Vortrag von *A. Gatterer*. Die Spektrochemie wird einerseits für die Analyse kostbarer Materialien (z. B. archäologischer Bronzen), anderseits für die *Gesteinsanalyse* und vor allem in der *industriellen Materialforschung* benützt, wie mehrere Vorträge bewiesen. Auch hier liegt zweifellos eines der aussichtsreichsten Arbeitsgebiete der Mikrochemie im weiteren Sinne vor.

Allgemeine Anerkennung und Anwendung haben die von *L.* und *A. Kofler* und ihren Schülern begründeten *mikroskopischen Methoden* gefunden, die Gemeingut der organischen Mikroanalytiker geworden sind. Forscher in verschiedenen Ländern arbeiten an der weiteren Ausgestaltung dieser Verfahren, die ja von *L.* und *A. Kofler* selbst buchmäßig dargestellt worden sind.

Eine ungebeugte Prophetin der *Mikromethoden* zur *Bestimmung* verschiedener *physikalischer Konstanten* ist nach wie vor die Grazerin *M. Sobotka*.

Zu den physikalischen Verfahren zählt auch die *Luminescenzanalyse*, die für die Spurensuche seltener Elemente verwendet wurde, während *fluorescenz-mikroskopische* Untersuchungen wichtige Ergebnisse in der *Biologie* zeitigten.

Wie bisher von allergrößtem Interesse für sämtliche Anwendungsgebiete der qualitativen anorganischen und organischen Mikroanalyse ist die *Tüpfelanalyse*, über deren heutigen Stand und künftige Entwicklungsmöglichkeiten ein Vortrag von *F. Feigl* und *Ph. W. West* unterrichtete. Die ständigen Berichte der „Kommission für neue analytische Reaktionen und Reagenzien" in der Union Internationale de Chimie unterstreichen diese aussichtsreiche Arbeitsrichtung. Sie erscheinen von Zeit zu Zeit in Buchform. Aufgabe der genannten Kommission ist die gewissenhafte Fundierung aller bisherigen Ergebnisse und die systematische Weiterforschung auf diesem Gebiete. Des weiteren zählt zu den Aufgaben der Kommission die Aufstellung neuer, exakter Definitionen über die Empfindlichkeit qualitativer Nachweisreaktionen: Diese Aufgabe haben sich besonders der Belgier *J. Gillis*, der Schweizer *P. E. Wenger* und der neu in die Kommission gewählte Österreicher *H. Malissa* zum Ziel gesetzt.

Die *internationale Zusammenarbeit* auf dem Gebiet der Mikrochemie soll durch eine in Graz neu beschlossene Kommission für Mikrochemie im Rahmen der Union gefördert werden, als deren Präsident der Wiener Professor *M. K. Zacherl* bestimmt worden ist.

Daß Mikrochemie übrigens nicht gleichbedeutend mit Mikroanalyse ist, dafür legten u. a. *H. Lieb* und *W. Schöniger* durch die Ausarbeitung mikropräparativer organischer Methoden Zeugnis ab.

3. Anwendungsgebiete.

Es gibt kaum eine Sparte oder ein Nachbargebiet der Chemie, wo nicht mikrochemische Methoden mehr oder weniger Bedeutung gewonnen haben. Die nachfolgende Hervorhebung soll nur einige besondere Anwendungsgebiete aufzeigen:

Moderne *Biochemie* und *Pharmazie* können ohne Mikromethoden nicht mehr auskommen. Einige Vorträge belegten diese Behauptung mit Beispielen. Es gilt dies sowohl für die qualitative als auch für die quantitative Richtung. Auch die *Gerichtsmedizin* verwendet Mikromethoden, insbesondere spektrochemische, ebenso die *Gehirnforschung*, worüber einzelne Vorträge berichteten. Mikromethoden sind unentbehrlich in der *Vitaminforschung* und in der *Balneologie* und *Gewässerforschung*. Ebenso ist in der *Lebensmittelchemie* die Zahl der Mikroverfahren, wie eine Sichtung der Literatur ergibt, bereits Legion, doch wird gerade auf diesem Gebiete eine Sonderung des Weizens von der Spreu vonnöten sein: eine Aufgabe, der sich *G. Gorbach* in Graz in vieljähriger Arbeit unterzogen hat.

Botanik und *Biologie* ziehen aus der Fluoreszenzanalyse neuerdings wesentlichen Nutzen.

Die *Erzanalyse* und die *Hüttenlaboratorien* gehen im großen Maße auf mikroanalytische Methoden über, desgleichen *Mineralogie*, *Mineralanalyse* und *Geochemie*. Alle diese genannten Gebiete könnten wertvollste Kenntnisse aus einer viel weitergehenden Heranziehung mikroanalytischer Methoden gewinnen, als dies bisher geschehen ist. Es ergeht daher der Ruf nach Forscherpersönlichkeiten, die über die nötige Übersicht der mikrochemischen Arbeitsmethoden einerseits, der Bedürfnisse der erwähnten Wissenschaften und ihrer Probleme anderseits verfügen, und noch viel mehr nach der Zusammenarbeit von Forschergruppen („teamwork").

Eine Anzahl von Vorträgen auf dem Kongress bewies, daß sich glücklicherweise die *Industrie* der Bedeutung mikrochemischer Methoden für die verschiedensten Zwecke, auch für die *Materialforschung*, immer intensiver bewußt wird.

Daß die Chemie der *Transurane* nur mit Hilfe von Mikro- und insbesondere Ultramikromethoden erforscht werden kann, ist bekannt, wenngleich eine Erwähnung dieses Gebietes auf dem Kongress unterblieb. Normal vorkommende *seltene Elemente*, z. B. das Germanium, waren mehrfach Gegenstand mikrochemischer Untersuchungen.

4. Unterricht.

Über die Einbeziehung der Mikrochemie in den Unterricht an den Hochschulen berichteten amerikanische Forscher, ferner die Belgierin *A. Lacourt* und der Schweizer *P. E. Wenger*. Diese Persönlichkeiten haben erkannt, daß eine Ausschaltung der jungen mikrochemischen Forschung und ihrer Methoden aus dem zeitgemäßen Chemieunterricht nicht mehr möglich ist. Es steht außer Zweifel, daß diese Erkenntnis schon viel weiter um sich gegriffen hat, als aus den wenigen Kongressvorträgen entnommen werden kann. Insbesondere in Österreich besteht seit Jahrzehnten die Möglichkeit, mikrochemische Methoden an einzelnen Hochschulen in Kursen zu erlernen. Es sei hier nur auf das „Pregl-Laboratorium" an der Universität Graz verwiesen. Aber auch der regelmäßige mikrochemische Unterricht im Rahmen des normalen chemischen Studienprogramms hat bereits begonnen und wird in der nächsten Zeit noch weiter ausgebaut werden. An der Grazer Technischen Hochschule wurde schon 1943 ein Institut für Mikrochemie und Geochemie begründet, das sich gegenwärtig gleichfalls den Unterricht der Mikrochemie angelegen sein läßt.

5. Literatur.

In der Buchausstellung war eine reichhaltige Sammlung mikrochemischen Schrifttums zu finden. Arbeiten mikrochemischen Inhaltes werden derzeit vorzugsweise in der österreichischen Zeitschrift „Mikrochemie vereinigt mit Mikrochimica Acta", der in Holland bzw. den USA. erscheinenden Zeitschrift „Analytica Chimica Acta", dem englischen Organ „Analyst" und der amerikanischen Zeitschrift „Analytical Chemistry", ferner in der deutschen „Zeitschrift für analytische Chemie", der französischen „Chimie analytique" und dem russischen Journal „Zawodskaja Laboratorija", leider aber auch verstreut in Zeitschriften anderer Gebiete veröffentlicht, wo sie für den Mikrochemiker oft nicht leicht erreichbar sind.

In der mikrochemischen Buchliteratur ist vorerst wohl noch immer der Springer-Verlag (Wien) führend. Aber auch die amerikanische, englische und russische Buchliteratur enthält mikrochemische Werke von hohem Rang.

Man darf der mikrochemischen Buchliteratur wohl vielfältige, erfolgreiche Ausweitung prophezeien.

Zusammenfassung.

Es wird versucht, aus den Vorträgen des IMC die *Hauptrichtungen* abzuleiten, in denen sich die heutige mikrochemische Forschung bewegt. Bei dieser Analyse werden vor allem gleichartige Gruppen von Vorträgen unter Zurücktreten einzelner Spezialberichte zusammengefaßt.

Als ordnende Gesichtspunkte werden folgende zugrunde gelegt: Apparative Hilfsmittel; Arbeitsmethodik; Anwendungsgebiete; Unterricht; Literatur.

Summary.

An attempt is made to deduce from the lectures of the IMC the main directions in which the present-day microchemical research is moving. In this analysis, similar groups of lectures, with decreased emphasis on individual special fields, were especially grouped together. The following directive view points were used as bases: apparative aids; working methods; fields of application; teaching; literature.

Résumé.

On essaie de dégager, à partir des conférences tenues au congrès international de microchimie, les idées directives vers lesquelles tend la recherche microchimique actuelle. Dans cette analyse, sont rassemblés, avant tout, des groupes voisins de communications en laissant de côté quelques travaux spécialisés. La classification est faite d'après le point de vue suivant: appareils, modes opératoires, domaines d'application, enseignement, bibliographie.

Österreichische Gesellschaft für Mikrochemie.

Statuten für die Verleihung der Friedrich-Emich- und Fritz-Pregl-Plakette.

I.

Zur Förderung der mikrochemischen Forschung und Verbreitung der Mikrochemie wird von der Österreichischen Gesellschaft für Mikrochemie eine *Friedrich-Emich-* und *Fritz-Pregl-*Plakette verliehen.

II.

Der Preis kann an jeden auf mikrochemischem Gebiete tätigen Chemiker verliehen werden.

III.

Der Preis wird höchstens einmal im Jahr verliehen. Im Falle des Fehlens eines geeigneten Vertreters kann der Preis auch durch mehrere Jahre hindurch nicht verliehen werden.

IV.

Die *Friedrich-Emich-*Plakette wird für Arbeiten auf dem Gebiet der allgemeinen und experimentellen Mikrochemie verliehen, die *Fritz-Pregl-*Plakette für Arbeiten auf dem Gebiet der angewandten Mikrochemie.

V.

Für die Verleihung wird ein Ausschuß gebildet, der aus dem Präsidenten, den zwei Vizepräsidenten und dem Sekretär der Österreichischen Gesellschaft für Mikrochemie besteht. Von diesen werden fallweise drei in- oder ausländische Berater und allenfalls Begutachter zugezogen, um die Internationalität der Verleihung zu gewährleisten.

VI.

Grundsätzlich können die Plaketten für Arbeiten mikrochemischen Inhalts verliehen werden. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit,

die Plaketten für Arbeiten zu verleihen, die nur oder hauptsächlich nur mit mikrochemischen Methoden durchgeführt werden konnten und eine meisterhafte Beherrschung dieser Methoden verlangen.

VII.

Die Preisverteilung erfolgt anläßlich der Hauptversammlung der Österreichischen Gesellschaft für Mikrochemie in feierlicher Weise durch Überweisung oder Übersendung der Plakette und einer künstlerisch ausgeführten Urkunde.

VIII.

Sollte der Fall eintreten, daß ein Mitglied des Verleihungsausschusses mit der Plakette bedacht werden soll, so scheidet für diese Verhandlung der Betreffende aus.

Abkürzungen	Abbreviations	Abréviations
Amer. J. Physiol.	American Journal of Physiology	
Analyst	The Analyst	
Analyt. Chemistry	Analytical Chemistry	
Analyt. Chim. Acta	Analytica Chimica Acta	
Ann. Chem.	Liebig's Annalen der Chemie	
Ann. chim.	Annales de chimie	
Ann. Physik	Annalen der Physik	
Ann. physique	Annales de physique	
Arch. Pharmaz.	Archiv der Pharmazie	
Arch. Physiol.	Archiv für Physiologie	
Arch. sci. phys. nat.	Archives des sciences physiques et naturelles	
Ark. Kemi, Mineral. Geol.	Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi	
Atti r. accad. Lincei	Atti della Reale Accademia dei Lincei	
Ber. dtsch. chem. Ges.	Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft	
Biochemic. J.	Biochemical Journal	
Biochem. Z.	Biochemische Zeitschrift	
Bull. soc. chim. France	Bulletin de la société de chimie de France	
CaEN	Chemical and Engineering News	
Chem. Abstr.	Chemical Abstracts	
Chem. Ind.	Die Chemische Industrie	
Chem. Weekbl.	Chemisch Weekblad	
Chem. Zbl.	Chemisches Zentralblatt	
Chem.-Ztg.	Chemiker-Zeitung	
C. r. acad. sci., Paris	Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences	
Helv. Chim. Acta	Helvetica Chimica Acta	
Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed.	Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition	
J. Amer. Chem. Soc.	Journal of the American Chemical Society	
J. Biol. Chem.	Journal of Biological Chemistry	
J. Chem. Education	Journal of Chemical Education	
J. Chem. Soc. London	Journal of the Chemical Society London	
J. Clin. Investigation	Journal of Clinical Investigation	
J. phys. chim.	Journal de physique et de chimie	
J. Physical Chem.	Journal of Physical Chemistry	
J. Physiol.	Journal of Physiology	
J. prakt. Chem.	Journal für praktische Chemie	
J. Soc. Chem. Ind.	Journal of the Society of Chemical Industry	
Kolloid-Beih.	Kolloid-Beihefte	
Kolloid-Z.	Kolloid-Zeitschrift	

Mikrochem.	Mikrochemie vereinigt mit Mikrochimica Acta
Monatsh. Chem.	Monatshefte für Chemie
Nature	Nature (London)
Naturwiss.	Die Naturwissenschaften
Pharmaz. Zentralhalle	Pharmazeutische Zentralhalle
Physikal. Z.	Physikalische Zeitschrift
Proceed. Royal Soc. London	Proceedings of the Royal Society of London
Rec. trav. chim. Pays-Bas	Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas
Science	Science
Trans. Royal Soc. London	Transactions of the Royal Society of London
Z. analyt. Chem.	Zeitschrift für analytische Chemie
Z. angew. Chem.	Zeitschrift für angewandte Chemie (Die Chemie)
Z. anorg. Chem.	Zeitschrift für anorganische Chemie
Z. Kristallogr.	Zeitschrift für Kristallographie
Z. Physik	Zeitschrift für Physik
Z. physik. Chem.	Zeitschrift für physikalische Chemie
Z. physiol. Chem.	Zeitschrift für physiologische Chemie

Die Autoren werden dringend gebeten, bei allen Literaturzitaten anzugeben:

1. Titel der Zeitschrift in obenstehender Abkürzung,
2. Eventuelle Serienzahl in eckiger Klammer,
3. Bandzahl unterstrichen,
4. Seitenzahl,
5. Jahreszahl in runder Klammer.

The authors are urged to cite all the references as follows:

1. Abbreviated title of the periodical according to the above list,
2. eventual number of series, enclosed in crotchets (square brackets),
3. number of volume, underlined,
4. page-number,
5. year, enclosed in parentheses (round brackets).

Les auteurs sont instamment priés d'indiquer leurs sources comme suit:

1. titre abrégé du périodique selon liste ci-dessus,
2. numéro éventuel de la série entre crochets,
3. numéro du volume, souligné,
4. page,
5. année, entre parenthèses ordinaires.

Herausgeber und Eigentümer: Springer-Verlag in Wien I, Mölkerbastei 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. *Michael Karl Zacherl*, Wien XIX, Chimanistraße 21.
Druck: Manzsche Buchdruckerei, Wien IX, Lustkandlgasse 52.